

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



TESIS DOCTORAL

**Relación entre los parámetros morfológicos, de gameto a blastocito,
con las anomalías cromosómicas y el éxito reproductivo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

M^a Arantzazu Delgado Mendive

Directores

Belén Martínez Madrid
M^a Desamparados Mercader Bayarri
Marcos Meseguer Escrivá

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS
MORFOLÓGICOS, DE GAMETO A
BLASTOCISTO, CON LAS ANOMALÍAS
CROMOSÓMICAS Y EL ÉXITO
REPRODUCTIVO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Arantzazu Delgado Mendive

Bajo la dirección de:

Dra. Belén Martínez Madrid

Dra. M^a Desamparados Mercader Bayarri

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

Madrid 2015

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el laboratorio de FIV y en el departamento de DGP del IVI-Valencia.



La Dra. Belén Martínez Madrid, Profesora de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Medicina y Cirugía Animal

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral Titulada "Relación entre los parámetros morfológicos, de gameto a blastocisto, con las anomalías cromosómicas y el éxito reproductivo" ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a M^a Arantzazu Delgado Mendive

Se considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Madrid, a 10 de septiembre de 2015

Dra. Belén Martínez Madrid

La Dra. M^a Desamparados Mercader Bayarri, Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia. Coordinadora del Departamento de Diagnóstico Genético Preimplantacional, Laboratorio de Fecundación In Vitro del Instituto Universitario – IVI Valencia

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral Titulada "Relación entre los parámetros morfológicos, de gameto a blastocisto, con las anomalías cromosómicas y el éxito reproductivo" ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a M^a Arantzazu Delgado Mendive

Se considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Madrid, a 10 de septiembre de 2015

Dra. M^a Desamparados Mercader Bayarri

El Dr. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor Europeo en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y Profesor del Máster en Biotecnología de la Reproducción Humana Instituto Universitario – IVI Valencia

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral Titulada "Relación entre los parámetros morfológicos, de gameto a blastocisto, con las anomalías cromosómicas y el éxito reproductivo" ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D^a M^a Arantzazu Delgado Mendive

Se considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Madrid, a 10 de septiembre de 2015

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

A Miren y Aitor, mis dos tesoros.

Después de tanto tiempo, por fin voy a presentar mi tesis doctoral, una deuda pendiente que tenía conmigo misma. Creí que nunca iba a llegar este momento...

Hace ya casi 21 años de mi primer día en una unidad de reproducción humana, y me parece que fue ayer. Me gustaría empezar con un agradecimiento general a todas aquellas personas que han compartido conmigo algún momento de mi carrera. Todos y cada uno de ellos han contribuido a mi formación profesional y a mi enriquecimiento personal, independientemente del departamento donde estuvieran.

Quiero dar las gracias a mis tres directores de tesis, sobre todo por la paciencia que han tenido estos años, sin agobiarme con plazos y respetando el ritmo que yo iba marcando.

Gracias Amparo, por la tesis (por tu implicación y profesionalidad), y por todo lo demás (siempre detallista y cariñosa con los míos). Todavía me acuerdo el día que me incorporé al IVI Valencia. Pendiente de que me adaptara al cambio y respetando siempre esas nuevas opciones para hacer el trabajo. Todavía hoy te sigo dando guerra, pero ser tan distintas es bueno para ambas y eso es lo que hace que funcione. Nos quedan muchas cosas por hacer juntas.

Gracias Marcos, por tu extraordinario cerebro, sobre todo estadísticamente hablando. Por sacar tiempo de donde no lo tienes. Es un honor y un privilegio contar con uno de los top ten speakers of the world como director y como compañero. Gracias por esa forma de ser que nos ameniza más de una jornada. You are special, my friend.

Gracias Belén por tu infinita paciencia estos años esperando que acabara la tesis, facilitándome los trámites con la universidad y siempre dándome ánimos. Yo quería ser doctora en veterinaria y hay un tema sentimental resuelto con esta tesis bajo tu dirección. Además de hablar largo y tendido sobre las correcciones, también he descubierto otras facetas tuyas más personales que me han encantado. Eres una magnífica veterinaria con otra visión de las cosas. Ha sido un placer tenerte como directora.

Gracias a los 10 doctores del tribunal por aceptar. Todos ellos brillantes profesionales muy ocupados, pero dispuestos a compartir un día tan importante para mí.

Gracias Alfonso, Irene y Fede. No solo por aceptar mi propuesta sino por todos estos años siendo amigos y confidentes. Qué importantes son los amigos, y vosotros lo sois. Cuánto me habéis ayudado en momentos muy duros. Jamás olvidaré tu carta de apoyo Irene. Y vosotros dos, mis “novios postizos”, siempre reconfortándome y apoyándome en público y en privado. No tenéis precio. Qué trío tan formidable.

Gracias Carmen Bou, mi CHUFA querida. No he conocido persona más generosa y de mejor talante que tú. Toda mi formación inicial te la debo a ti, una magnífica embrióloga. Con qué elegancia y deportividad aceptaste que la niñata pusiera en marcha el ICSI. Vaya sapo te hicieron tragar amiga...Espero y deseo que tu carrera y tu prestigio profesional sean reconocidos como mereces de una vez. Te echo mucho de menos en el laboratorio y todo lo malo que pasamos nos unió aún más. Me quedan las carcajadas en esos 10 años y no las cambio por nada.

Gracias Victoria, mi otro gran apoyo en Ginefiv. Qué hubiera hecho sin ti. Siempre defensora a muerte de mi causa. Me has hecho sentir parte de tu familia y has sido muy generosa conmigo. Siempre a mi lado en los peores momentos, te estoy muy agradecida. Eres una ginecóloga magnífica y valiente, y una gran amiga.

Gracias Mon Ricar. Gran compañero y amigo leal. Siempre conmigo en los buenos y malos momentos. Lo que daría por tenerte conmigo en el laboratorio. Eres el mejor técnico del mundo.

Gracias a todos los compañeros de Ginefiv que estuvieron conmigo esos 10 años. Siempre queda lo bueno, que es lo que de verdad importa.

Gracias a todos los compañeros del IVI Bilbao. ¡Qué cambio y qué experiencia! Trabajamos muy duro en esos dos años que compartimos, pero también tuvimos tiempo de reírnos y de pasar buenos ratos.

Gracias Sonia por ser como eres. ¡Qué descubrimiento de persona! Noble y amiga incondicional. Estos últimos 10 años han sido estupendos contigo. Beti zurekin lagun.

GRACIAS a TODOS los compañeros del laboratorio del IVI Valencia. Todos y cada uno de vosotros habéis aportado algo a esta tesis: cediéndome horas de estudio, ayudándome con el manejo del programa para la bibliografía (un gran avance, gracias Belén), dándome consejos los que ya sois doctores... Entre todos formamos un equipo estupendo y muy competente. Juntos somos muy fuertes. Esta tesis no hubiera sido posible sin vosotros. Escribir algo de cada uno sería interminable...Gracias otra vez.

Gracias a las biopsiadoras del rincón (8262 embriones son muchos).

Gracias Agalancha, porque aunque nuestro comienzo no fuera con el pie derecho, hoy tenemos una amistad que me alegra el trabajo y la vida. No cambies nunca amiga, eres única.

Gracias Lauritxu, porque cuando llegaste, algo cambió para siempre en mi rutina. Amiga y confidente, no puedo imaginar mejor compañera en el laboratorio.

Gracias Damiá. Por tu VALOR, y por compartir experiencias formidables.

Gracias Paloma y Carol, siempre incondicionales. PODEMOS.

Gracias a todo el equipo de Igenomix por su rigor y profesionalidad en los análisis. Esta tesis también va por vosotros.

Gracias Bego, la persona más solidaria que conozco. Siempre conmigo y con mi familia. Te queremos.

Gracias a los Cruz Moya, por acogerme y quererme. Por ser mi apoyo diario, y por tratarme como a una hija.

Gracias Paloma, ROSI querida. Decía tu padre, el gran Paco, que yo era su tercera hija. De verdad que así lo he sentido siempre. Eres mi hermana, y nos ha tocado vivir cosas muy duras que no han hecho más que fortalecer esta amistad. Gracias por tu apoyo incondicional siempre.

Gracias Eufemia, GOLDEN o Susana, es lo mismo. Mi otra hermana desde los 14 años. Tan opuesta a mí y tan igual a la vez. Nobleza y generosidad personificada. La amiga que nunca falla, que me quiere como soy. Compañeras de estudios...esta tesis va por ti amiga.

Al clan MENDIVE, Inma, Javi y Karmele, a quienes tengo al mismo nivel que mi propia madre. Sois maravillosos. Gracias por estar ahí.

Al resto del clan vitoriano, José, Maruja, Marta, Íñigo, Teresa, Víctor, al resto de primos. Todos sois parte importante de mi vida. Gracias.

A mi abuela, Budi Budi, a la que adoraba. Gracias por ser la mejor abuela del mundo. Siempre estarás conmigo.

A mis queridos hermanos Frikimon, con quienes compartí también parte de mi vida en Madrid. Os echo mucho de menos y estoy muy orgullosa de vosotros. Os cuidaba, os cuido y os cuidaré, no lo puedo evitar. Os quiero.

Gracias a mis padres, grandes impulsores de mis estudios. ¡Qué diría el abuelo Víctor si pudiera ver a su nieta defendiendo una tesis doctoral, con lo comprometido que estaba él con la educación de sus hijos, y de esa hija mayor tan lista!. He llegado hasta aquí gracias a vuestro esfuerzo y sacrificio, y espero que el título de doctora, salde en parte esa deuda impagable que tengo con vosotros. Ojalá estéis tan orgullosos de mí, como yo lo estoy de vosotros. Os quiero muchísimo.

Gracias Wilma, mi preciosa perra, por las horas que has estado tumbada a mi lado haciéndome compañía en el ordenador.

A mis hijos, Aitor y Miren, por ser infatigables, alegres y el motivo para levantarme todos los días. Sois los mejores hijos que jamás hubiera soñado tener. Gracias chiquitines, os adoro.

Y por último y no menos importante, gracias a ti, Txuki chico. Por fin hemos terminado la tesis, porque de verdad que también es tuya. Los últimos diez años han sido los mejores de mi vida. Gracias por aguantarme, que sé que a veces no es fácil, por soportar estoicamente mi genio y sobre todo gracias por quererme. Me haces ser mejor. Maite zaitut.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	19
ÍNDICE DE FIGURAS	23
ÍNDICE DE TABLAS	25
ABREVIATURAS	27
RESUMEN	31
SUMMARY	35
I INTRODUCCIÓN	39
1 ORIGEN Y ETIOLOGÍA DE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.	41
1.1 Clasificación de las anomalías cromosómicas.	42
1.2 Meiosis.	46
1.2.1 Meiosis femenina.	47
1.2.1.1 Factores/Mecanismos que dan lugar a las aneuploidías de origen materno.	48
1.2.2 Meiosis masculina.	49
1.2.3 Eventos críticos de la meiosis masculina.	51
1.3 Anomalías en el blastocisto.	53
2 RELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA Y ANEUPLOIDÍAS.	54
2.1 Criterio de clasificación ASEBIR.	55
2.1.1 Embriones.	55
2.1.2 Blastocistos.	58
2.2 Consenso de Estambul.	60
2.2.1 Morfología ovocitaria.	60
2.2.2 Morfología del cigoto.	62
2.2.3 Morfología del embrión en día 2 y 3 de desarrollo.	63
2.2.3.1 Número de células.	63
2.2.3.2 Fragmentación.	63
2.2.3.3 Multinucleación.	64
2.2.3.4 Simetría y Velocidad de Desarrollo.	65
2.2.3.4.1 Simetría.	65
2.2.3.4.2 Velocidad de desarrollo.	65
2.3 Morfología embrionaria (IVI).	66
3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.	66
3.1 Definición.	66
	19

3.2	Indicaciones.	67
3.2.1	Herencia ligada a los cromosomas sexuales.	67
3.2.2	Alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales.	68
3.2.3	Estudio de aneuploidías en pacientes de mal pronóstico.	68
3.2.3.1	Edad materna avanzada.	68
3.2.3.2	Parejas con fallo repetido de implantación.	69
3.2.3.3	Parejas con aborto de repetición de causa desconocida.	69
3.2.3.4	Parejas con factor masculino severo.	70
II	OBJETIVOS	73
1	Objetivo principal.	73
2	Objetivos secundarios.	73
III	MATERIAL Y MÉTODOS	77
1	TIPO DE ESTUDIO. PACIENTES Y CARACTERÍSTICAS.	77
2	CULTIVO EMBRIONARIO.	77
2.1	Cultivo estándar.	78
2.2	Cocultivo.	79
2.3	Medios de cultivo.	82
3	PARÁMETROS DE MORFOLOGÍA.	82
3.1	Morfología espermática.	83
3.2	Morfología embrionaria.	84
3.2.1	Morfología del cigoto, patrón pronuclear.	85
3.2.2	Número de células.	87
3.2.3	Fragmentación.	87
3.2.4	Simetría.	88
3.2.5	Multinucleación.	89
3.2.6	Contacto intercelular y compactación.	90
3.3	Morfología del blastocisto.	91
3.3.1	Según su evolución.	91
3.3.2	Según el tipo de masa celular interna (MCI).	92
3.3.3	Según el tipo de trofoblasto (TE).	93
4	ESTIMULACIÓN.	93
5	PUNCIÓN OVOCITARIA.	94
6	MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA.	96
6.1	Indicaciones de la ICSI.	97
6.2	Aspectos prácticos de la ICSI.	97
6.3	ICSI con semen muy patológico.	101
7	BIOPSIA EMBRIONARIA.	101

7.1	Definición.	102
7.2	Protocolo de biopsia en D3.	102
7.3	Fijación de células.	103
8	ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).	103
9	Transferencia embrionaria.	106
10	Análisis estadístico.	109
10.1	Regresión logística.	109
10.2	Curvas ROC.	110
10.3	Odds Ratio.	110
10.4	Intervalo de confianza.	111
IV	RESULTADOS	115
1	DESCRIPTIVOS POBLACIONALES.	115
1.1	Descripción de la cohorte embrionaria del estudio.	115
1.2	Descriptivos de la población de estudio.	117
2	ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS (marcadores o variables relacionados y/o predictivas).	118
2.1	Morfología embrionaria.	118
2.2	Variables clínicas.	128
2.2.1	Etiologías (modelo edad etiologías).	128
2.2.2	Estimulación (modelo edad estimulación).	128
2.3	Modelo predictivo final.	129
2.4	Modelo predictivo de anomalía cromosómica en base a parámetros embrionarios y edad.	132
2.5	Análisis de la prueba diagnóstica.	132
3	GESTACIÓN CLÍNICA (marcadores o variables relacionadas y/o predictivas de gestación clínica).	133
3.1	Morfología embrionaria.	133
3.2	Variables clínicas.	138
3.2.1	Etiologías (modelo edad implantación).	138
3.2.2	Estimulación (modelo edad estimulación).	140
3.3	Modelo predictivo final implantación DGP.	142
3.4	Probabilidad de implantación.	144
3.5	Análisis de la prueba diagnóstica.	144
V	DISCUSIÓN	147
1	ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.	149
1.1	Morfología embrionaria.	150

1.2	Variables clínicas.	154
1.2.1	Etiologías.	154
1.2.2	Estimulación.	155
1.3	Modelo predictivo final. Anomalías cromosómicas.	156
2	GESTACIÓN CLÍNICA.	157
2.1	Morfología embrionaria.	158
2.2	Variables clínicas.	159
2.2.1	Etiologías.	159
2.2.2	Estimulación.	160
2.3	Modelo predictivo final de implantación en un programa de DGP.	160
VI	CONCLUSIONES	165
VII	BIBLIOGRAFÍA	169

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE LA MEIOSIS FEMENINA	47
FIGURA 2: INCIDENCIA DE TRISOMÍAS Y EDAD MATERNA (HASSOLD AND HUNT, 2001)	49
FIGURA 3: MEIOSIS MASCULINA	50
FIGURA 4: IMAGEN DE UN EMBRIÓN HUMANO COCULTIVADO SOBRE UNA MONOCAPA DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES	79
FIGURA 5: CIGOTO CORRECTAMENTE FECUNDADO.	86
FIGURA 6: PATRONES PRONUCLEARES.	86
FIGURA 7: TIPO DE FRAGMENTACIÓN. A) TIPO I B) TIPO II C) TIPO III D) TIPO IV .	88
FIGURA 8: SIMETRÍA EMBRIONARIA. A) SIMETRÍA TIPO1 B) SIMETRÍA TIPO2 C) SIMETRÍA TIPO 3 D) SIMETRÍA TIPO 4.	89
FIGURA 9: MULTINUCLEACIÓN. A) NORMAL B) MULTINUCLEADO.	90
FIGURA 10: COMPACTACIÓN. A) GRADO 0 B) GRADO 1 C) GRADO 2 D) GRADO 3.	91
FIGURA 11: CLASIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS SEGÚN EVOLUCIÓN. A) BLASTOCISTO TEMPRANO, B) BLASTOCISTO CAVITADO, C) BLASTOCISTO EXPANDIDO, D) BLASTOCISTO INICIANDO <i>HATCHING</i> , E) BLASTOCISTO <i>HATCHED</i> .	92
FIGURA 12: CLASIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS SEGÚN TIPO DE MASA CELULAR INTERNA (MCI). A) TIPO A, B) TIPO B, C) TIPO C, D) TIPO D	93
FIGURA 13: CLASIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS SEGÚN EL TIPO DE TROFECTODERMO (TE). A) TIPO A B) TIPO B, C) TIPO C, D) TIPO D	93
FIGURA 14: MICROINYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES.	101
FIGURA 15: BIOPSIA EMBRIONARIA.	103
FIGURA 16: FISH EN NÚCLEOS (EMBRIÓN NORMAL Y ANOMALÍAS).	106
FIGURA 17: ESQUEMA DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA VÍA VAGINAL.	107
FIGURA 18: CÁNULAS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.	109
FIGURA 19: RESULTADOS. CURVA ROC CON VARIABLES DE MORFOLOGÍA DEL CIGOTO.	120
FIGURA 20: RESULTADOS. CURVA ROC MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 2.	122
FIGURA 21: RESULTADOS. CURVA ROC MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 3.	124
FIGURA 22: RESULTADOS. CURVA ROC DE MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 4.	126
FIGURA 23: RESULTADOS. CURVA ROC DE MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 5.	127
FIGURA 24: RESULTADOS. CURVA ROC MODELO PREDICTIVO FINAL MORFOLOGÍA.	131
FIGURA 25: RESULTADOS. CURVA ROC MODELO PREDICTIVO IMPLANTACIÓN DÍA 5.	137
FIGURA 26: RESULTADOS. CURVA ROC MODELO PREDICTIVO IMPLANTACIÓN ETIOLOGÍAS.	139
FIGURA 27: RESULTADOS. CURVA ROC MODELO PREDICTIVO ESTIMULACIÓN E IMPLANTACIÓN.	141
FIGURA 28: RESULTADOS. CURVA ROC MODELO PREDICTIVO FINAL IMPLANTACIÓN.	143

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CLASIFICACIÓN ASEBIR DÍAS 2 Y 3 SEGÚN RITMO DE DIVISIÓN.	56
TABLA 2: CLASIFICACIÓN ASEBIR DÍAS 2 Y 3 SEGÚN MORFOLOGÍA.	56
TABLA 3: CLASIFICACIÓN ASEBIR DÍA 2.	57
TABLA 4: CLASIFICACIÓN ASEBIR DÍA 3.	57
TABLA 5: CLASIFICACIÓN ASEBIR DÍA 4.	58
TABLA 6: CLASIFICACIÓN ASEBIR DE CATEGORÍAS PARA MCI Y TROFOECTODERMO.	59
TABLA 7: CLASIFICACIÓN ASEBIR DE CATEGORÍAS DEL BLASTOCISTO EN DÍA 5.	59
TABLA 8: CLASIFICACIÓN ASEBIR DE CATEGORÍAS DEL BLASTOCISTO EN DÍA 6.	60
TABLA 9: DESCRIPCIÓN COHORTE EMBRIONARIA DÍA 4.	115
TABLA 10: DESCRIPCIÓN COHORTE EMBRIONARIA DÍA 5.	115
TABLA 11: DESCRIPCIÓN COHORTE EMBRIONARIA NORMALES/ANORMALES.	116
TABLA 12: DESCRIPCIÓN MORFOLOGÍA COHORTE EMBRIONARIA DÍA 5 POR CATEGORÍAS.	116
TABLA 13: DESCRIPCIÓN MORFOLOGÍA EMBRIONARIA DÍAS 2 Y 3 DE DESARROLLO.	117
TABLA 14: CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.	117
TABLA 15: RESULTADOS. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA.	118
TABLA 16: RESULTADOS. PATRÓN PRONUCLEAR.	119
TABLA 17: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA CON VARIABLES DE MORFOLOGÍA DEL CIGOTO.	120
TABLA 18: RESULTADOS. MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 2 DE DESARROLLO.	121
TABLA 19: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA DE MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 2.	122
TABLA 20: RESULTADOS. MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 3 DE DESARROLLO.	123
TABLA 21: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA DE MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 3.	124
TABLA 22: RESULTADOS. MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 4 DE DESARROLLO.	125
TABLA 23: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA DE MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 4.	126
TABLA 24: RESULTADOS. MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 5.	126
TABLA 25: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA DE MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN EN DÍA 5.	128
TABLA 26: RESULTADOS. MODELO EDAD ESTIMULACIÓN.	128
TABLA 27: RESULTADOS. MODELO PREDICTIVO FINAL MORFOLOGÍA.	130
TABLA 28: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA MODELO PREDICTIVO FINAL MORFOLOGÍA.	131
TABLA 29: RESULTADOS. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA E IMPLANTACIÓN.	133
TABLA 30: RESULTADOS. PATRÓN PRONUCLEAR E IMPLANTACIÓN.	134
TABLA 31: RESULTADOS. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 2 E IMPLANTACIÓN.	134
TABLA 32: RESULTADOS. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 3 E IMPLANTACIÓN.	135
TABLA 33: RESULTADOS. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 4 E IMPLANTACIÓN.	135
TABLA 34: RESULTADOS. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 5 E IMPLANTACIÓN.	136
TABLA 35: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA MODELO PREDICTIVO IMPLANTACIÓN DÍA 5.	137
TABLA 36: RESULTADOS. ETIOLOGÍA E IMPLANTACIÓN.	138
TABLA 37: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA. MODELO PREDICTIVO IMPLANTACIÓN ETIOLOGÍAS.	139

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 38: RESULTADOS. MODELO PREDICTIVO ESTIMULACIÓN E IMPLANTACIÓN.	140
TABLA 39: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA MODELO PREDICTIVO ESTIMULACIÓN E IMPLANTACIÓN.	141
TABLA 40: RESULTADOS. MODELO PREDICTIVO FINAL IMPLANTACIÓN.	142
TABLA 41: RESULTADOS. ÁREA BAJO LA CURVA MODELO PREDICTIVO FINAL IMPLANTACIÓN.	143

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ALPHA	sociedad científica alpha
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ASEBIR	asociación para el estudio de la biología de la reproducción
ATP	adenosín trifosfato
BC	blastocisto cavitado
BE	blastocisto expandido
BLAST	blastocisto
BN	binucleada
BH	blastocisto <i>hatched</i> (eclosionado)
BHi	blastocisto <i>hatching</i> (eclosionando)
BT	blastocisto temprano
C	cromátida
CCM®	<i>co-culture medium</i> (medio de cultivo registrado)
CCO	complejo cúmulo-ovocito
CEL	células
CGH	hibridación genómica comparada
CITOP	citoplasmática
CM ²	Centímetro cuadrado
COR	característica operativa del receptor (ROC)
CPN	cuerpos precursores de nucléolos
D	día
DGP	diagnóstico genético preimplantacional
DMEM	dulbeccos modified eagle's medium
E2	estradiol
EOC	estimulación ovárica controlada
ESHRE	<i>european society of human reproduction and embryology</i> (sociedad europea de reproducción humana y embriología)
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FIV	fecundación <i>in vitro</i>
FPR	razón o <i>ratio</i> de falsos positivos
FRAG	fragmentación
FSH	hormona folículo estimulante
GIE	grupo de interés en embriología
GLM	modelos lineales generalizados
GnRH	hormona liberadora de gonadotropina
HCG	gonadotropina coriónica humana
HMG	gonadotropina menopáusica humana
IC	intervalo de confianza
ICSI	microinyección intracitoplasmática de espermatozoides
IVF®	<i>in vitro fertilization</i> (medio de cultivo registrado)
IVI	instituto valenciano de infertilidad
Kb	kilobase
LH	hormona luteinizante
M	mórula
MCI	masa celular interna
MII	metafase II
mg	miligramo
ml	mililitro
mm ²	milímetro cuadrado

ABREVIATURAS

MN	multinucleada
μl	microlitro
μm	micrómetro
mOms	miliosmolar
ms	milisegundo
Na+	sodio
OR	<i>odds ratio</i> (posibilidades de relación)
OMS	organización mundial de la salud
P	probabilidad
P4	progesterona
Pb	par de bases
PCA	<i>poor cell adherence</i> (adherencia celular pobre)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGS	<i>preimplantational genetic screening</i> (cribado genético preimplantacional)
PVP	polivinil pirrolidona
ROC	<i>receiver operating characteristic</i> (característica operativa del receptor)
SC	complejo sinaptonémico
SCP	<i>synaptonemal complex protein</i> (complejo proteico sinaptonémico)
SS	sin salto
TE	trofoectodermo
TRA	técnica de reproducción asistida
UI	unidades internacionales
U/min	unidades por minuto
VPR	razón de verdaderos positivos
ZP	zona pelúcida

RESUMEN

RESUMEN

El uso de la estimulación ovárica controlada (EOC) en los tratamientos de reproducción asistida (TRA) tiene como consecuencia, en la mayoría de los ciclos, la obtención de múltiples ovocitos maduros, por lo que el número de embriones disponibles para transferir suele ser elevado.

Muchos embriones morfológicamente óptimos, que son transferidos al útero, no logran implantar o generan gestaciones que finalizan en abortos espontáneos. Algunos de estos fracasos pueden ser explicados por la presencia de anomalías cromosómicas de los embriones seleccionados para la transferencia.

La estrategia más común, en la mayoría de los laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV), para identificar los embriones viables capaces de dar lugar a una gestación evolutiva (mayor o igual a 12 semanas), está basada en criterios morfológicos tales como el número de células y la simetría de las mismas, la presencia de multinucleación, el porcentaje de fragmentación y la velocidad de desarrollo. Sin embargo, alguno de los aspectos más importantes de la viabilidad embrionaria, como la carga cromosómica, son indetectables mediante la clásica observación morfológica.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral fue valorar la posible correlación entre la morfología del embrión en día 3 de desarrollo, y sus anomalías cromosómicas, con el fin de establecer un modelo predictivo.

Además, como objetivos secundarios, se valoró la posible correlación entre la morfología del embrión, en estadio de mórula y blastocisto, y sus anomalías cromosómicas, y una vez conocida dicha relación, se estudió la tasa de implantación dentro del programa de diagnóstico genético preimplantacional (DGP) del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia (IVI Valencia).

Para alcanzar estos objetivos, se analizaron los embriones de todas las pacientes incluidas en el programa de DGP para cribado de aneuploidías (aborto de repetición, edad materna avanzada, fallo de implantación, factor

RESUMEN

masculino severo y cromosomopatías previas) durante el periodo comprendido entre enero de 2000 y abril del 2007

Los embriones fueron biopsiados en día tres de desarrollo y las células extraídas analizadas mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Los embriones cromosómicamente normales o euploides fueron transferidos al útero en día 5 de desarrollo. Los embriones fueron clasificados según el protocolo de rutina del laboratorio de FIV del IVI Valencia.

Se pretendió cuantificar el efecto que determinados patrones clínicos ejercían sobre la posibilidad de normalidad cromosómica del embrión, así como sobre la implantación embrionaria en el programa de DGP.

Con los resultados obtenidos, se dedujo que en día 2 y 3 de desarrollo, a mayor simetría y menor multinucleación existía mayor probabilidad de euploidía. Cuanto mayor era el número de células respecto a lo esperado en esos dos días, disminuía esa posibilidad y en cuanto a la fragmentación, solo parecía tener influencia en día 3 y referida a porcentaje. Un aumento de la fragmentación implicaba un descenso en las posibilidades de euploidía, si bien el tipo no era relevante en ninguno de los dos días de desarrollo.

Además, la morfología embrionaria en día 4 y día 5 nos sugirió que a mayor desarrollo del embrión, mayor era la posibilidad de ser euploide. Al combinar la morfología de estos dos días se pudo observar que ambas se relacionaban, predominando el efecto de día 5 sobre el de día 4.

En cuanto a la implantación, a mayor evolución del blastocisto euploide, mayor era su probabilidad de implantar una vez transferido al útero.

Los resultados obtenidos confirmaron que el uso de la morfología embrionaria, como única herramienta de selección, no permitía descartar los embriones aneuploides. Son, por lo tanto, necesarias técnicas complementarias como el DGP, para conocer la carga cromosómica de los embriones transferidos en el laboratorio de FIV y aumentar así las posibilidades de éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

Palabras clave: euploidía, morfología embrionaria, implantación, DGP.

SUMMARY

SUMMARY

The use of controlled ovarian stimulation (COS) in assisted reproduction treatment (ART) results in most cycles, obtaining multiple mature oocytes, thus the number of embryos available for transfer is usually high.

Many morphologically optimal embryos, transferred to the uterus, fail to implant or generate pregnancies ending in spontaneous abortions. Some of these failures can be explained by the presence of chromosomal abnormalities in embryos selected for transfer.

The most common strategy, in most in vitro fertilization (IVF) laboratories, to identify viable embryos capable of leading to a progressive pregnancy (greater than or equal to 12 weeks), is based on morphological criteria such as the number of cells and symmetry thereof, the presence of multinucleation, the percentage of fragmentation and development speed. However, one of the most important aspects of embryo viability, as chromosome load, is undetectable by the conventional morphological observation.

The main objective of this thesis was to evaluate the possible correlation between embryo morphology on day 3 of development, and chromosomal abnormalities, in order to establish a predictive model.

Moreover, as secondary objectives, the possible correlation between the embryo's morphology, in morula and blastocyst state, and its chromosomal abnormalities was assessed and comprehended, then, the implantation rate was studied in the preimplantation genetic diagnosis (PGD) program of the Valencian Infertility Institute (IVI Valencia).

To achieve these objectives, the embryos of all patients included in the PGD program for aneuploidy screening (recurrent miscarriage, advanced maternal age, implantation failure, severe male factor and previous chromosomal abnormalities) were analyzed during the period from January 2000 to April 2007. The embryos were biopsied on day three of development and the extracted cells were analyzed using the fluorescence *in situ*

SUMMARY

hybridization (FISH) technique. The chromosomally normal or euploid embryos were transferred to the uterus on day 5 of development. The embryos were classified according to IVI Valencia's IVF laboratory protocol routine.

We aimed to quantify the effect of certain clinical patterns exerted on the possibility of chromosomal normality of the embryo, and on embryo implantation in the PGD program.

Once we had obtained the results, it was concluded that in day 2 and 3 of development, with greater symmetry and less multinucleation, euploidy was more likely. This possibility decreased when the number of cells expected during these two days was high, and regarding fragmentation, it only seemed to have influence on day 3 and referred to percentage. Increased fragmentation implied a decline in the possibility of euploidy, although the type wasn't relevant in either days of development.

Furthermore, embryo morphology in day 4 and day 5 suggested that the more the embryo developed, the greater the chance of being euploid. By combining the morphology of these two days it was observed that both connected, predominantly the effect of day 5 on day 4.

As for implantation, the greater the evolution of the euploid blastocyst, the greater its chance of implant once transferred to the uterus.

The results confirmed that the use of embryo morphology, as unique selection tool, didn't permit preclude aneuploid embryos. Therefore, complementary techniques such as PGD proved necessary to determine the chromosomal load of embryos transferred in IVF laboratory and thus increase the chances of success of assisted reproduction treatments.

Key words: euploidy, embryo morphology, implantation, PGD.

INTRODUCCIÓN

I INTRODUCCIÓN

Desde que hace tres décadas se implantara con éxito la fecundación in vitro (1) se han ido realizando numerosos avances que nos han permitido mejorar los resultados iniciales.

A resaltar, en relación a la parte clínica del procedimiento, nuevos y más eficientes fármacos, protocolos de estimulación ovárica mejorados, así como la aparición de la aspiración folicular transvaginal, guiada por ultrasonidos (2), que han supuesto una gran mejora.

Por otra parte, en el laboratorio de FIV, se han optimizado los medios de cultivo permitiendo extender el tiempo de cultivo del embrión hasta blastocisto (3), y se han implementado un sinnúmero de estrictos controles de calidad sobre las condiciones de cultivo: como la temperatura, la iluminación, y la composición de gases en los incubadores. La introducción de la Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) (4) y el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), (5, 6) han supuesto un enorme avance en las técnicas de reproducción asistida.

Además, las técnicas de crioconservación de gametos y embriones también han mejorado muy notablemente, sobre todo con la reciente incorporación de la vitrificación como técnica de rutina en el laboratorio, lo cual nos ha permitido alcanzar tasas de gestación muy similares entre los ciclos con transferencia en fresco y los ciclos con transferencia en diferido (7). En los últimos tiempos, todo esto ha sido complementado con la tecnología *time lapse*, que ha supuesto un avance considerable en los métodos de selección embrionaria así como una mejora en las tasas de implantación(8).

Lo que no ha cambiado, desde los inicios, ha sido el método de elección de los embriones candidatos a transferencia en el útero: la evaluación morfológica por el embriólogo/a ayudada por el microscopio invertido (9). Esto supone un método no invasivo para el embrión pero tiene sus desventajas en cuanto a que es altamente subjetivo y requiere gran experiencia. Además, está restringido a momentos puntuales de observación dentro de la rutina del

INTRODUCCIÓN

laboratorio, por lo que conlleva una pérdida de información del desarrollo global del embrión. A todo esto, hay que añadir el estrés que se genera en los embriones al aislarlos temporalmente de sus condiciones óptimas de cultivo para su evaluación bajo el microscopio.

Los principales parámetros a tener en cuenta en la evaluación morfológica del embrión previo al estadio de blastocisto son: número de células, grado y tipo de fragmentación, simetría y multinucleación. En el estadio de blastocisto, evaluamos el número de células y la morfología de la masa celular interna, el trofoectodermo y el grado de expansión del blastocelo (10).

Adicionalmente, se tienen en cuenta otros parámetros como el patrón pronuclear (11, 12), el desarrollo temprano (13) y la morfología ovocitaria (14).

Actualmente, y gracias a los avances antes mencionados, las parejas que se someten a un tratamiento de FIV, disponen de un mayor número de embriones candidatos para la transferencia y/o vitrificación. La mayor limitación de la fecundación *in vitro* es la correcta elección de los embriones a transferir, de manera que los elegidos sean los que posean una mayor viabilidad y un elevado potencial de implantación. Las estadísticas muestran que en uno de cada tres ciclos de FIV se consigue embarazo y que aproximadamente 1 de cada 5 embriones consigue implantar (15). Estos datos nos dan una idea del escaso valor predictivo del análisis morfológico y explicarían la tendencia a transferir un mayor número de embriones, elevándose con ello el riesgo de gestaciones múltiples.

Aproximadamente el 30% de los embriones generados en tratamientos de FIV presentan una constitución cromosómica anómala (16). Este porcentaje puede incrementarse, hasta el 60%, en embriones procedentes de parejas con mal pronóstico reproductivo como las pacientes con baja respuesta ovárica, mujeres de edad materna avanzada y pacientes con fallos de implantación previos.

En referencia al desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto, sabemos que aproximadamente el 25% de los embriones aneuploides alcanzan el estadio de blastocisto, mientras que los euploides lo hacen en más

de un 60%. También se ha visto que un porcentaje muy bajo de monosomías llegan a blastocisto, sin embargo, las trisomías alcanzan este estadio en un porcentaje importante. Esto confirmaría los datos que se obtienen en los abortos espontáneos (17).

La morfología de los embriones humanos es un parámetro que parece estar relacionado de manera destacable con las anomalías cromosómicas, ya que los embriones dismórficos, los de desarrollo lento y los bloqueados muestran significativamente más poliploidía y mosaicismo que los embriones con una morfología adecuada y un desarrollo normal (18, 19).

La incidencia de mosaicismo y su repercusión en un posible error de diagnóstico ha sido muy discutida. Munné y colaboradores observaron que el 39,6% de los embriones bloqueados y el 25,2% de los embriones fragmentados y/o con desarrollo lento presentaban mosaicismo, mientras que este porcentaje disminuía al 14,1% en embriones con buena evolución (Munné et al. 2006).

Estudios más recientes (20) postulan que el grado de mosaicismo descende progresivamente a medida que avanza el desarrollo embrionario. Así, nos encontramos con diferencias significativas entre los resultados obtenidos por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en embriones de día 4 frente a los de día 5 y día 8.

1 ORIGEN Y ETIOLOGÍA DE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

Hace ahora aproximadamente medio siglo que se identificaron las primeras concepciones humanas aneuploides (anomalías cromosómicas numéricas), y desde entonces la investigación se ha centrado en las siguientes cuestiones:

1. La frecuencia de las aneuploidías y su importancia clínica.
2. El origen del cromosoma en exceso/defecto.
3. Los mecanismos que producen las aneuploidías.

La primera de estas cuestiones ya ha sido resuelta (21) y sabemos que al menos un 5% de los embarazos clínicos son trisómicos (ganancia de un determinado cromosoma) o monosómicos (pérdida de un determinado cromosoma). La mayoría de este tipo de gestaciones aneuploides finalizan en un aborto en el primer trimestre de embarazo, pero en algunos casos (trisomías 13, 18, 21 y de los cromosomas sexuales, así como la monosomía X) son compatibles con la vida y representan la causa principal de niños nacidos con alteraciones congénitas y/o discapacidad intelectual.

1.1 Clasificación de las anomalías cromosómicas.

De forma general podemos definir dos tipos de anomalías cromosómicas:

1. Anomalías numéricas: Afectan al número total de cromosomas. Las podemos clasificar a su vez en dos tipos:
 - a. Aneuploidías: Ganancia o pérdida de un cromosoma concreto, como es el caso de la trisomía 21, con tres cromosomas 21 (síndrome de Down) o la monosomía X, con sólo un cromosoma X (síndrome de Turner).
 - b. Alteraciones de la ploidía: Afecta al número total de cromosomas, de modo que cuando existe un complemento cromosómico de más se denomina triploidía ($3n$) y si se trata de dos sets de cromosomas en exceso se denomina tetraploidía ($4n$). Por el contrario, cuando existe un único set de cromosomas se denomina haploidía ($1n$).
2. Anomalías estructurales: Afectan a la estructura de cromosomas específicos e implican rotura y reorganización de fragmentos de uno o más cromosomas:
 - a. Traslocaciones: Implican la rotura e intercambio de fragmentos cromosómicos entre dos cromosomas, habitualmente de dos pares cromosómicos distintos, aunque

también se pueden producir entre los dos cromosomas del mismo par cromosómico. Se clasifican en:

Robertsonianas: Se produce por la fusión de dos cromosomas acrocéntricos que son los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. Estos cromosomas tienen el centrómero muy cerca del extremo final resultando en un brazo p muy corto. Cuando se produce esta fusión, se pierden los extremos y los dos cromosomas quedan unidos en uno, por lo que los individuos portadores de este tipo de traslocaciones tienen 45 cromosomas en lugar de 46.

Recíprocas: Se producen por transferencia de segmentos entre dos cromosomas de tal forma que se modifica la configuración pero no el número total de cromosomas.

- b. **Inversiones:** Implican la rotura en dos regiones de un mismo cromosoma y la inversión y reorganización del fragmento invertido dentro del mismo cromosoma. Se clasifican en pericéntricas (el fragmento invertido incluye el centrómero del cromosoma implicado) y paracéntricas (el fragmento invertido no incluye el centrómero).
 - c. **Deleciones:** Es la pérdida de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) de un cromosoma. Una deleción puede producirse en el extremo de un cromosoma (deleción terminal) o a lo largo de uno de sus brazos (deleción intersticial).
3. **Mosaicismo:** Además, hay que tener en cuenta que las anomalías descritas pueden presentarse de forma similar en la totalidad de las células de un organismo o embrión, o pueden presentarse en mosaico, lo que implica la coexistencia de dos o más líneas celulares con distinta constitución genética. La segregación anormal de los cromosomas se puede producir en la meiosis, dando lugar a aneuploidías, pero también puede ocurrir en la mitosis, dando lugar a mosaicismo. Los errores en la mitosis

pueden comenzar en la primera división celular del cigoto o posteriormente, y esto determinará la extensión de la condición de mosaico en el embrión, con porcentajes diferentes de cada línea celular. El alcance de la anomalía fenotípica dependerá de la proporción relativa de los distintos tipos de células y de en qué momento del desarrollo haya tenido lugar la no correcta disyunción. De forma general podemos diferenciar 4 tipos de mosaicismo:

- a. Mosaico Euploide/Aneuploide: Aquel en que una línea celular tiene una dotación cromosómica normal ($2n$) y la otra tiene una dotación cromosómica aneuploide.
- b. Mosaico Aneuploide/Aneuploide: Aquel en el que ambas líneas celulares presentan una anomalía cromosómica pero no es la misma. Dentro de esta categoría podemos encontrar el mosaicismo complementario, que es cuando ambas líneas celulares tienen dotaciones anómalas pero son complementarias, como por ejemplo monosomía 13 / trisomía 13 ($2n - 1/2n + 1$).
- c. Mosaicismo Mixoploide: Cuando se originan diferentes líneas celulares con alteraciones en la ploidía como $2n/4n$.
- d. Mosaicismo Caótico: Existen 5 o más líneas celulares con dotaciones cromosómicas diferentes.

La distribución del mosaicismo en el organismo depende de varios factores como el momento en que se produce, de las líneas celulares implicadas, de la viabilidad celular y de los cromosomas implicados. También se puede ver influido por el centrosoma del espermatozoide, que mediante los centriolos, es el que controla la primera división mitótica tras la fecundación, formándose un huso mitótico bipolar normal (22, 23), por lo que es necesaria la integridad del centrosoma para que se produzca una división mitótica normal. Por lo tanto, un número anormal de centrosomas o la existencia de

centriolos defectuosos, harán que el huso mitótico no se forme correctamente (22, 24, 23). Este hecho nos hace pensar si la calidad y/o el origen de la muestra seminal podrían influir en el porcentaje de embriones mosaico que se obtienen al analizar una cohorte embrionaria.

Respecto a la morfología del espermatozoide, se ha comprobado que al microinyectar espermatozoides morfológicamente normales, el porcentaje de embriones mosaico es significativamente menor al obtenido microinyectando espermatozoides anormales (25).

Al comparar con el grupo control (normozoospermia), lo que se obtiene es que, excepto en los sémenes con oligozoospermia, el porcentaje de embriones mosaico fue significativamente superior en muestras seminales con teratozoospermia, con FISH de espermatozoides anormal y en las provenientes de testículo por azoospermias tanto secretoras como obstructivas (26).

También pueden ser causa de una desorganización del huso mitótico una baja oxigenación de los folículos, distintas condiciones adversas del laboratorio (27) , así como distintos protocolos de estimulación (28).

Además, también se ha visto que embriones que presentan multinucleación en el estadio de 2 células, en día 2 de desarrollo, dan lugar a mayor porcentaje de mosaicismo. La multinucleación consiste en la presencia de 2 o más núcleos en una misma célula, pudiéndose dar en una célula del embrión, en varias o en todas.

Los embriones de pacientes portadores de traslocaciones, tanto Robertsonianas como recíprocas, presentan un alto porcentaje de embriones mosaico (29).

1.2 Meiosis.

La meiosis es el proceso en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas en las células somáticas diploides para dar lugar a los gametos haploides. De forma general, la meiosis comienza con una duplicación del ADN, dando lugar a las cromátidas hermanas, para a continuación producirse dos divisiones sucesivas en las que, en primer lugar, se segregan los cromosomas homólogos y en la segunda división se produce la segregación de las cromátidas hermanas. Se trata de un proceso coordinado de forma muy fina para que se produzca la exacta repartición de los cromosomas en las células hijas resultantes. Errores en la formación de microtúbulos (huso meiótico) que aproximan los cromosomas en la placa meiótica, así como en el apareamiento (sinapsis) o en la recombinación de los cromosomas homólogos (*crossing-over* o quiasmas), dan lugar a una segregación anormal, con diferente dotación cromosómica en las células hijas resultantes, lo que de forma general se denomina no disyunción meiótica, que puede producirse tanto en la meiosis I como en la meiosis II. Los errores en la meiosis I son los más frecuentes y la meiosis femenina es la más proclive a errores meióticos, por lo tanto es mayor la producción de aneuploidías de origen materno que de origen paterno.

Durante la primera división meiótica o meiosis I, se reduce el número de cromosomas de 46 (diploide) a 23 (haploide). Se divide en cuatro fases: Profase I, en la cual se pueden diferenciar 5 etapas: leptotene, zigotene, paquitene, diplotene y diacinesis, Metafase I, Anafase I y Telofase I. La segunda división meiótica o meiosis II es una división que se limita a repartir los cromosomas recibidos, en forma de cromátidas, a las células hijas sin que exista una replicación de ADN en la interfase. Se divide también en cuatro fases: Profase II, Metafase II, Anafase II y Telofase II.

Los eventos básicos de la meiosis se reflejan en una serie de procesos específicos: el emparejamiento y la sinapsis entre cromosomas homólogos y la formación del complejo sinaptonémico (SC), que regula la cohesión entre cromátidas hermanas. Un punto crítico también es la recombinación entre cromosomas homólogos y la orientación de los dos centrómeros de cada

bivalente. Un fallo en alguno de estos pasos puede dar lugar a aneuploidías o fallos en la segregación.

1.2.1 Meiosis femenina.

La meiosis femenina presenta la particularidad de su larga duración (Figura 1). Las células germinales dan origen a las oogonias, y estas se transforman en ovocitos cuando inician la primera división meiótica y se detienen en su profase I. Este proceso comienza en las semanas 11-12 de gestación. La progresión de la meiosis, hasta la etapa de diplotene, continúa durante el resto del embarazo y está completa en el momento del nacimiento. La meiosis se reanuda, años más tarde, cuando se produce la madurez sexual. Un ovocito completa la meiosis I cuando madura su folículo, produciendo un ovocito secundario y el primer corpúsculo polar. Después de la ovulación, cada ovocito continúa hasta la metafase de la meiosis II. La meiosis II se completa sólo si se produce fecundación, lo que resulta en un óvulo maduro fecundado y la extrusión del segundo corpúsculo polar.

De forma muy frecuente el primer corpúsculo polar no se divide y el producto final de la meiosis femenina es un ovocito y dos corpúsculos polares.

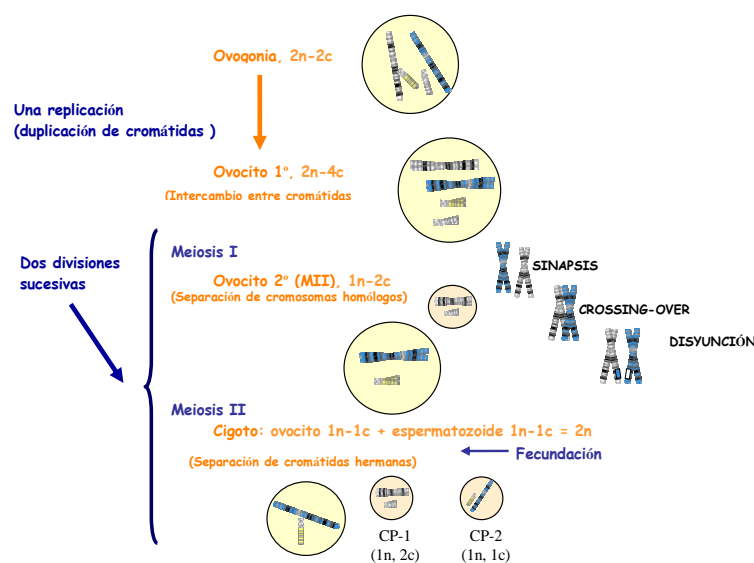


Figura 1: Esquema de la meiosis femenina¹

¹ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana (IVI).

1.2.1.1 Factores/Mecanismos que dan lugar a las aneuploidías de origen materno.

A pesar de la elevada incidencia de las aneuploidías y de su repercusión clínica, sabemos muy poco de los factores que controlan la disyunción de los cromosomas y dan lugar a las aneuploidías.

Desde hace más de 30 años, se conoce que el síndrome de Down se produce por la trisomía del cromosoma 21 y estudios sobre esta y otras trisomías han revelado que su incidencia de las mismas se incrementa con la edad materna pasando, del 2% en mujeres de 25 años, al 35% en mujeres con más de 40 años (30) (Figura 2). Sin embargo, desconocemos los mecanismos básicos que producen el aumento de las aneuploidías con la edad. Recientemente, varios estudios sugieren que podría haber una disminución en la recombinación entre algunos pares de cromosomas homólogos y que este fenómeno, asociado a defectos en la formación del huso, relacionados con la edad, podrían aumentar la no-disyunción al menos de algunos pares de cromosomas, lo que se conoce como *two-hits hypothesis* (31).

Otra hipótesis sobre la relación de las aneuploidías con la edad materna avanzada propone la posibilidad de un acortamiento de los telómeros del ovocito. La longitud de los telómeros se acorta con la edad debido a la disminución de la actividad de la enzima telomerasa, estando este mecanismo de envejecimiento celular relacionado con diferentes enfermedades (32).

A nivel reproductivo, se ha descrito que la integridad de los telómeros es necesaria para la correcta formación del huso meiótico y la alineación de los cromosomas, así como que los procesos de sinapsis y recombinación meiótica pueden verse afectados por la disminución del tamaño de los telómeros (33). Más recientemente, se ha relacionado el acortamiento de los telómeros con dos patologías reproductivas, el aborto de repetición y el fallo ovárico precoz, que podrían estar asociados a un envejecimiento celular prematuro o a un mayor estrés ambiental (34).

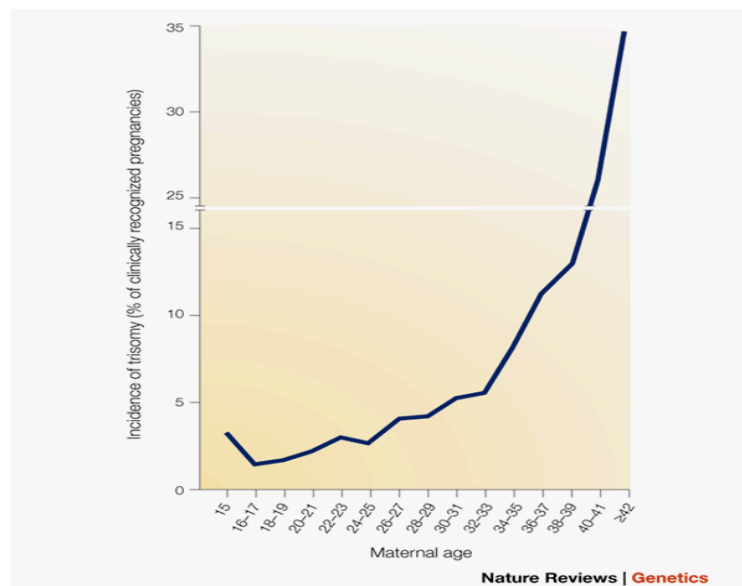


Figura 2: Incidencia de trisomías y edad materna (Hassold and Hunt, 2001)

Se han estudiado otros factores, no relacionados con la edad materna, que pudieran dar lugar a una mayor predisposición a las aneuploidías, entre ellos: exposición a pesticidas, disruptores endocrinos, quimioterapia/radioterapia, tratamientos hormonales, tabaco, etc. Sin embargo, no se ha conseguido demostrar la relación directa de ninguno de estos factores con la incidencia de aneuploidías. Los únicos tres factores que se consideran hoy en día indiscutiblemente relacionados con las aneuploidías son: la edad materna, la recombinación anormal y la existencia de trisomías previas. Esto no significa que no existan otros factores implicados, pero se necesitan laboriosos estudios epidemiológicos para poder demostrar, por ejemplo, la influencia del efecto de la exposición al medio ambiente.

1.2.2 Meiosis masculina.

La formación de gametos masculinos y femeninos difiere considerablemente. Aunque la secuencia de acontecimientos es la misma, su cronología es muy distinta.

La espermatogonia fetal derivada de las células germinales primordiales, está en los cordones testiculares, rodeada por células de Sertoli. A diferencia

INTRODUCCIÓN

de lo que ocurre con las femeninas, las células germinales masculinas no comienzan la división meiótica antes de la pubertad, y una vez la inician, ésta no cesa. Además, mantienen la proliferación mitótica a nivel de las espermatogonias.

Otra de las diferencias, entre la meiosis femenina y la masculina, es que en esta última, como resultado final, se producen cuatro células haploides (espermátidas) de cada célula diploide (espermatocono primario), (Figura 3), mientras que en la femenina solo se produce una célula haploide como resultado (ovocito).

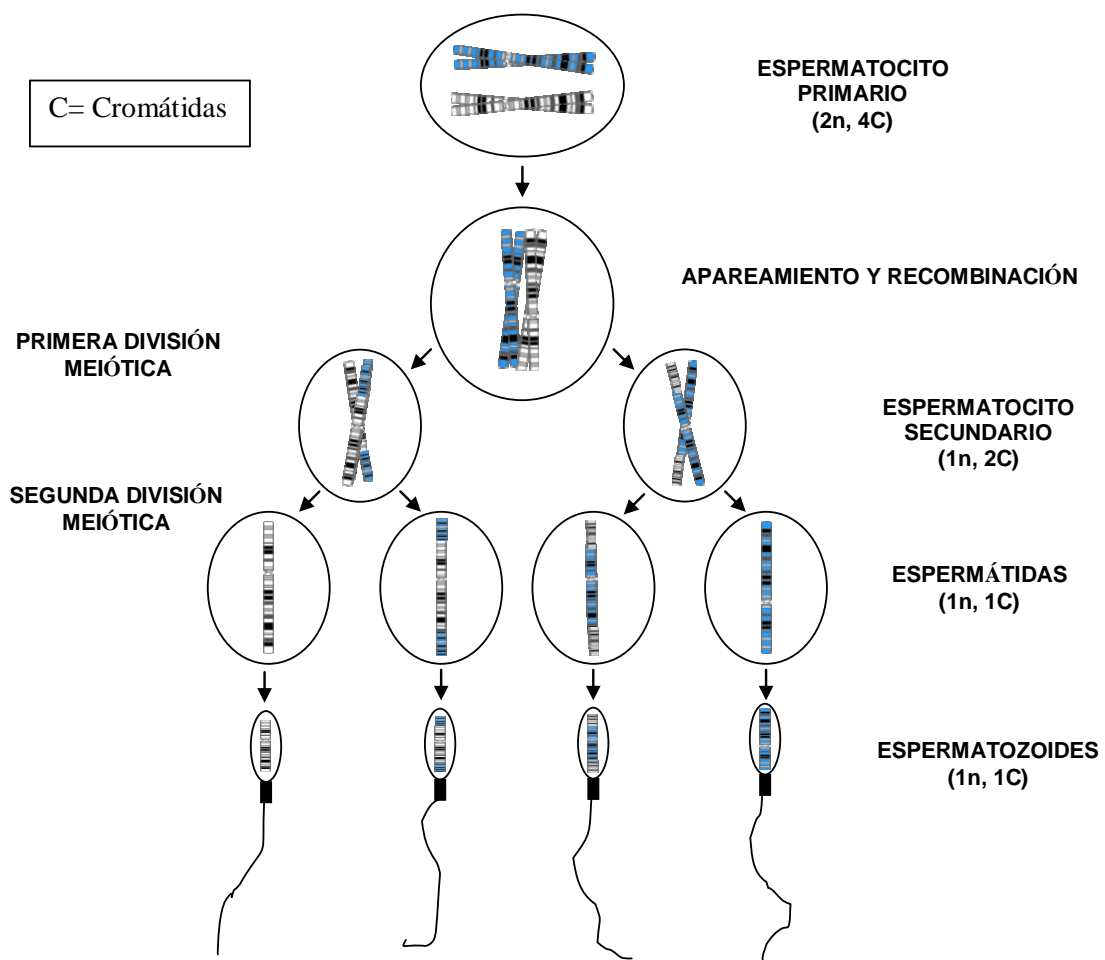


Figura 3: Meiosis masculina²

A nivel molecular, en la meiosis masculina el huso meiótico está organizado por centriolos que aporta el espermatozoide.

² Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

Esta propiedad facilita la orientación de los centrómeros, en los polos opuestos del huso, mientras que la meiosis femenina es acentriolar y el huso bipolar es organizado por el conjunto de todos los cromosomas.

1.2.3 Eventos críticos de la meiosis masculina.

Dentro de la meiosis masculina, la profase I es de especial importancia ya que se producen dos eventos críticos: la sinapsis, en la que los miembros homólogos de cada pareja de cromosomas se encuentran, y la recombinación, proceso de intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, destinado a aumentar la variabilidad genética de la descendencia. Muchas de las técnicas utilizadas para el estudio de la meiosis masculina se han centrado en valorar la sinapsis de los cromosomas homólogos.

Dentro de la profase I, en Leptotene comienza la condensación de los cromosomas y su aproximación. En Zigotene, los cromosomas continúan acortándose y engrosándose y al final de esta fase son visibles, entre el par de homólogos, unas estructuras denominadas elementos laterales. A medida que prosigue la meiosis, la longitud de los elementos laterales aumenta y comienza a formarse entre los homólogos el complejo sinaptonémico que es el entramado proteico que va a mantener a los cromosomas homólogos en sinapsis durante todo el proceso, dispuesto longitudinalmente a lo largo de cada bivalente. Está compuesto por un grupo triple de bandas en paralelo: los elementos laterales – adherido cada uno a un cromosoma homólogo – y un elemento central paralelo unido por fibras transversas.

Se han identificado 3 componentes proteicos del complejo sinaptonémico (*Synaptonemal Complex Protein*): SCP1, SCP2, SCP3. De éstos, los anticuerpos monoclonales frente a SCP3 son los más utilizados en estudios inmunocitogenéticos, porque se localiza en los primeros componentes que se forman del complejo sinaptonémico (elementos axiales) y se puede utilizar para monitorizar el ensamblaje y desensamblaje del SC durante la profase. Patrones alterados en la distribución de SCP3 nos van a permitir detectar problemas en la sinapsis centrándose el estudio sobre todo en la fase de Paquítene de la profase I, donde se completa el proceso de sinapsis.

INTRODUCCIÓN

A continuación, en Diplotene, cada par de cromátidas hermanas comienza a separarse, sin embargo uno o más puntos permanecen en contacto (hasta la metafase I), por el lugar donde las cromátidas se habían entrelazado. Cada uno de estos puntos se llama quiasma y se cree que representa el lugar en donde las cromátidas hermanas sufren intercambio genético o entrecruzamiento y se conoce como recombinación.

Aunque el intercambio físico ocurre en Paquitene, el resultado del entrecruzamiento sólo es visible mediante técnicas convencionales, cuando los cromosomas duplicados comienzan a separarse.

Sin embargo, recientemente, se han desarrollado anticuerpos específicos que nos permiten identificar los puntos de rotura y recombinación del ADN en la etapa de Paquitene. Ya en la etapa final de la Profase I, la Diacinesis, los cromosomas alcanzan su máxima condensación.

En la metafase I, desaparece la membrana nuclear y se forma un huso. Los pares de cromosomas homólogos emigran al plano ecuatorial del huso, con sus centrómeros orientados hacia polos diferentes, formando la placa metafásica. Este es otro punto crítico de todo el proceso y con técnicas convencionales se puede visualizar si la localización de los cromosomas es la adecuada.

En la anafase I, los dos miembros de cada bivalente se separan y sus respectivos centrómeros, con sus cromátidas hermanas prendidas, son dirigidas a los polos opuestos de la célula, un proceso denominado disyunción. Al final de la telofase I y la citocinesis, se originan los dos espermatocitos secundarios con dotación cromosómica $1n$, pero con dos cromátidas por cada cromosoma.

La segunda división meiótica es similar a una mitosis normal excepto en que el número de cromosomas de la célula que entra en meiosis II es haploide. El resultado final son 4 células haploides, los espermatozoides, cada uno con 23 cromosomas y una cromátida cada cromosoma.

1.3 Anomalías en el blastocisto.

El cultivo prolongado hasta blastocisto en día 5 y 6 de desarrollo, se ha propuesto como una herramienta para seleccionar embriones con buena morfología y un alto potencial de implantación y de esta manera, también poder excluir ciertas anomalías (35, 36), aunque esta estrategia podría ser útil sólo en determinados grupos de pacientes donde la incidencia de anomalías cromosómicas esperada es baja (37).

Sin embargo, mediante el diagnóstico genético preimplantacional, se ha comprobado que algunas anomalías también se presentan en el estadio de blastocisto. El grupo de Magli (38), observó que existe un 22% de embriones anormales que pueden evolucionar hasta el estadio de blastocisto, aunque en el caso de los embriones euploides el porcentaje es mayor (34%), resultados que han sido corroborados por otros grupos, (39, 16, 40, 21).

Teniendo en cuenta los datos del estudio de Rubio (41), la tasa de llegada a blastocisto fue del 66% en euploides, 37% en las trisomías, 9% en las monosomías, 21% en las poliploidías, 0%-5% en los haploides y 13% para los mosaicos diploides.

Las monosomías X y 21 se encuentran en el estadio de blastocisto y son compatibles con desarrollos del primer trimestre, concordando estos datos con los que se tienen de los abortos de repetición (17). Las trisomías 15, 16 y 22 son, sin embargo, incompatibles con la vida. Un pequeño porcentaje de trisomías 13, 18 y 21 llegan a término, aunque la mayoría acaban en aborto durante el primer o el segundo trimestre de gestación. No ocurre lo mismo con la mayoría de las trisomías de los cromosomas sexuales, que sí son capaces de llegar a término.

En teoría, la selección embrionaria basada en la evaluación morfológica, es una herramienta muy útil para conseguir buenas tasas de gestación y de implantación, así como embarazos a término. Parece claro que un buen embrión es el que procede de un cigoto bipronuclear, con un buen patrón y que presente 4 células en día 2 y 8 células en día 3, sin fragmentación o con una

INTRODUCCIÓN

presencia menor del 15%. Además, las células deben ser simétricas y la multinucleación debe estar ausente de ellas.

Además, la técnica de cultivo prolongado nos permite obtener blastocistos con alto potencial de implantación pero no exentos de algún tipo de anomalía cromosómica.

Con todo lo visto hasta ahora, podríamos decir que la combinación de la selección embrionaria junto con el diagnóstico genético preimplantacional resulta de mucha utilidad en determinados grupos de pacientes sometidas a fecundación *in vitro*.

2 RELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA Y ANEUPLOIDÍAS.

A pesar de que la llegada de técnicas como la metabolómica y el uso del *time lapse* pudieran potenciar el chequeo no invasivo de los embriones humanos *in vitro*, las clínicas de fecundación *in vitro* continúan actualmente seleccionando embriones para transferir basándose, como criterio principal, en las características morfológicas del embrión y en su velocidad de desarrollo.

Sin embargo, los diferentes esquemas usados por los embriólogos/as a la hora de clasificar los embriones hacen muy difícil la comparación entre clínicas.

En España contamos con un esquema propio a través de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción).

Respecto a Europa, existen también unas recomendaciones en cuanto a la valoración de los embriones, que vienen dadas por el Consenso de Estambul (42). En él, un grupo de reconocidos embriólogos/as pautaron criterios de calidad para la clasificación morfológica de los embriones.

2.1 Criterio de clasificación ASEBIR.

Para el sistema de clasificación, según los criterios de ASEBIR, se ha empleado la opción de cuatro categorías divididas en función del potencial de implantación esperado:

1. Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
2. Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
3. Categoría C: Embrión regular con una probabilidad de implantación media.
4. Categoría D: Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja. Incluye los embriones multinucleados.

Se han propuesto sistemas de clasificación tanto para embriones de día 2 y día 3 de desarrollo, así como para blastocistos en día 5 y 6 de desarrollo. También se hace referencia al día 4 aunque no de una forma tan detallada.

Para ello, se tienen en cuenta los diferentes parámetros morfológicos que se evalúan de rutina en el laboratorio de FIV y que vienen reflejados en las tablas que se presentan a continuación (Tablas de la 1 a la 8).

2.1.1 Embriones.

En los embriones de día 2 de desarrollo, se valora un conjunto de características tales como el ritmo de división, el porcentaje de fragmentación, la morfología de la zona pelúcida, alteraciones citoplasmáticas, multinucleación, simetría y presencia de vacuolas. La valoración de todas las características, en su conjunto, es lo que determina la clasificación final del embrión.

INTRODUCCIÓN

Para la clasificación de embriones de día 3 de desarrollo, se tienen en cuenta las anteriores características y su evolución desde día 2.

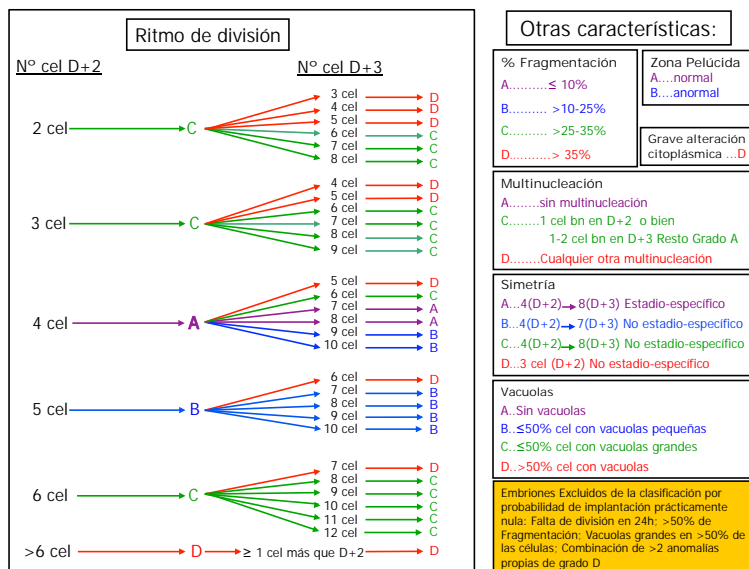


Tabla 1: Clasificación ASEBIR días 2 y 3 según ritmo de división.

GRADO (1)	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
A	D+2	4	≤10%	estadio- específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
B	D+2	5	>10-25%	4→7 cel NO estadio- específico en D+3	NO	≤50% cel con vacuolas pequeñas, o bien ZP Anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
C	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 cel NO estadio- específico	1 cel bn D+2, o bien 1-2 cel bn D+3 y el resto como Grado A (2)	≤50% cel con vacuolas grandes
	D+3	2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10 6, 11, 12				
D	D+2	3 (NO estadio-específico), >6	>35%	3 cel No estadio- específico en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% cel con vacuolas, o bien Grave Alteración citop.(3)
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				
Embriones Excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h; >50% de Fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D						

(1) Cualquier parámetro negativo propio de un determinado grado, aún combinado con otras características propias de grados más positivos, hace clasificar el embrión con el grado correspondiente a la característica más negativa. Además, al no ser características "sumativas", la combinación de varias características negativas propias de un determinado grado, no suponen penalización adicional sobre la presencia de tan solo una de esas características negativas.

(2) "mn"= Multinucleada. "bn"= Binucleada. Excepción a la regla de que cualquier multinucleación conlleva clasificar como grado D.

(3) Por ejemplo: Anillo citoplasmático muy evidente en D+3

Tabla 2: Clasificación ASEBIR días 2 y 3 según morfología.

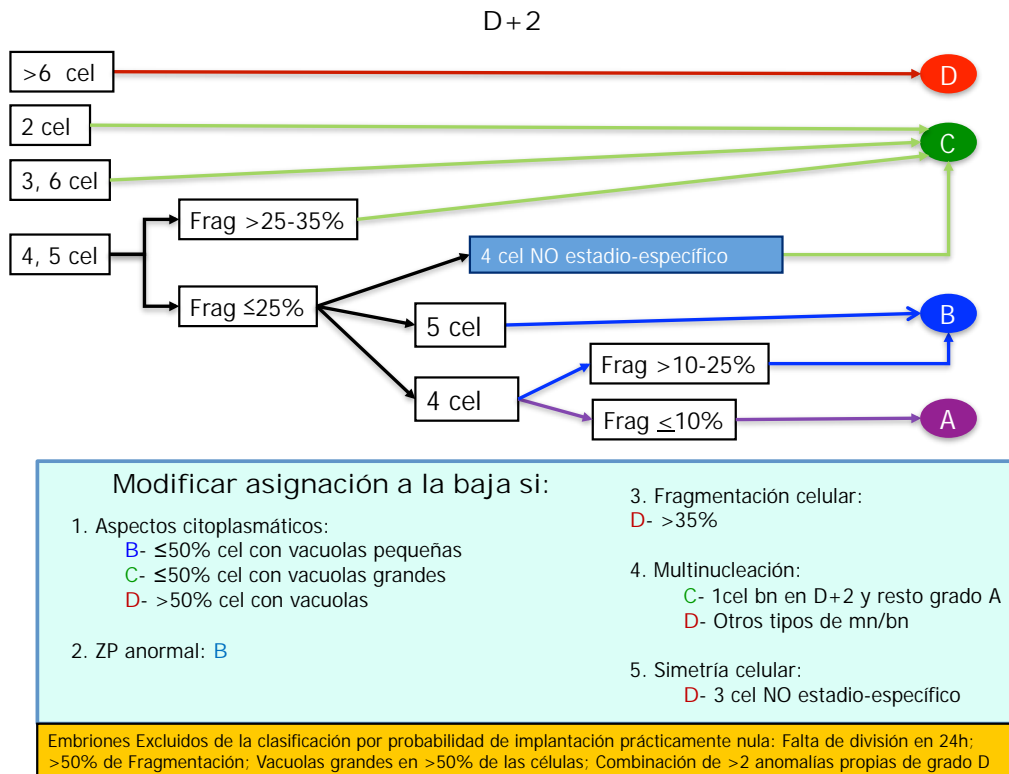


Tabla 3: Clasificación ASEBIR día 2.

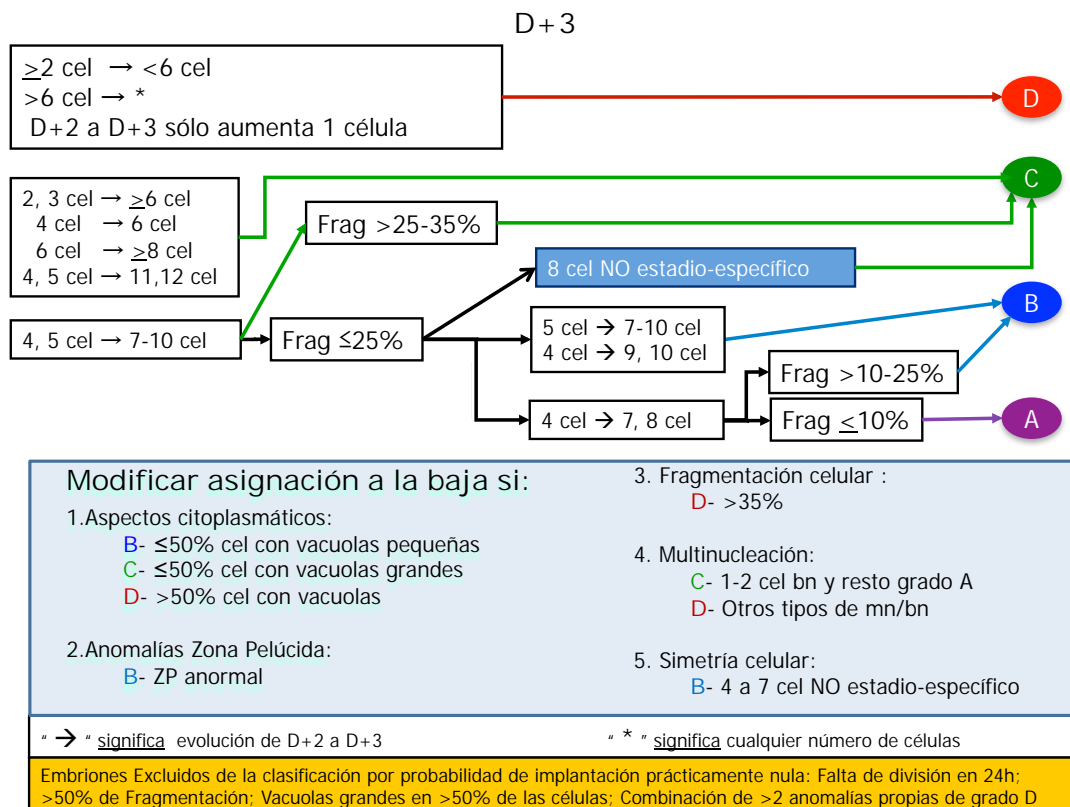


Tabla 4: Clasificación ASEBIR día 3.

D + 3	Características morfológicas D + 4	D + 4
A	Cavitación temprana Compactación total y >8 cel	A
	Compactación parcial (1-2 cel excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cel excluidas) No compactación (> 8 cel)	C
B	Cavitación temprana Compactación total y >8 cel Compactación parcial (1-2 cel excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cel excluidas) No compactación (> 8 cel)	C
C	Cavitación temprana Compactación total y ≥8 cel	C
D	Compactación parcial No signos compactación (> 8 cel)	D
	Cualquier característica	

Cualquier embrión que presente en D + 4:
Fragmentación celular >35%
Excesiva vacuolización.
Compactación < 50% embrión
≤8 células sin signos de compactación

D

Excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula los embriones que presenten una combinación de >2 características propias de Grado D

Tabla 5: Clasificación ASEBIR día 4.

2.1.2 Blastocistos.

Para la clasificación morfológica de los blastocistos, se tienen en cuenta parámetros como la masa celular interna (MCI), el trofoectodermo (TE), y el grado de expansión, todo ello en los días 5 y 6 de desarrollo.

Además, también se tiene en cuenta el día de llegada a blastocisto como un parámetro de calidad.

Respecto al día 4 de desarrollo, se registran dos características que son la llegada a mórula y la compactación o no de la misma.

Categoría	Tamaño MCI (μm^2)	Cohesión
A	3800-1900	Compacta
B	3800-1900	No compacta
C	1900	Indiferente
D	Signos de degeneración	
Excluidos	Degenerada	

Categoría	Descripción del Trofoectodermo
A	Homogéneo, cohesionado y muchas células
B	Homogéneo; menos células
C	Pocas células
D	Signos de degeneración
Excluidos	Degenerado

Tabla 6: Clasificación ASEBIR de categorías para MCI y TE.

D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		D	A,B,C o D	D
	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)			C
Mórula no compacta	Mórula			D

Tabla 7: Clasificación ASEBIR de categorías del blastocisto en día 5.

D+5	D+6			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Ecllosionando"	A	A	B
			B	
			C	
			D	
		B	A	B
			B	
			C	
			D	
		C	A	B
			B	
			C	
			D	
	D	A,B,C o D	D	
	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)			D
Mórula no compacta	Mórula		Excluidos de la Clasificación	

Tabla 8: Clasificación ASEBIR de categorías del blastocisto en día 6.

2.2 Consenso de Estambul.

Es el resultado de una reunión de trabajo donde un grupo de expertos embriólogos/as pertenecientes a dos sociedades científicas, ALPHA y ESHRE, revisó y definió los criterios de valoración morfológica.

2.2.1 Morfología ovocitaria.

La viabilidad final de un embrión está directamente influenciada por la normalidad nuclear y la maduración citoplasmática durante el periodo preovulatorio. La detección precoz de lo que llamamos dismorfismos citoplasmáticos (43) se utiliza de rutina para seleccionar los ovocitos a inseminar.

Sin embargo, mientras que ciertos dismorfismos se relacionan con fracasos de fecundación, cuando se utiliza la FIV como técnica de inseminación, a partir de la aparición de la ICSI, estos mismos ovocitos

fecundan y parecen dar lugar a embriones que, al menos en los primeros estadios de desarrollo, parecen llevar una evolución normal.

Lo cierto es, que un gran número de embriones procedentes de ovocitos dismórficos no evoluciona hasta el estadio de blastocisto, lo que sugiere que esos defectos inherentes pueden tener consecuencias directas sobre el desarrollo. La asociación entre las características ooplásmicas y un desarrollo posterior comprometido necesita de más estudios complementarios.

Tras una estimulación ovárica, se obtienen ovocitos de buena calidad y otros que no hubieran alcanzado la madurez si no fuera por el uso de hormonas exógenas, debido a la desincronización de la maduración nuclear y citoplasmática producida (44).

En algunos casos, hay ovocitos demasiado maduros (45), en otros, nos encontramos con inmadurez, que puede derivar en la formación de un ovocito gigante diploide (46) o en el fracaso del desarrollo del huso meiótico, el cual no es visible bajo el microscopio invertido.

Los cambios en la maduración citoplasmática podrían influir sobre su funcionalidad posterior. Además, el desarrollo embrionario posterior también parece correlacionado con el tamaño y el número de anomalías ovocitarias, que pueden ser subdivididas en:

1. Intracitoplasmáticas: Vacuolas, acúmulo de retículo endoplásmico, cuerpos refringentes y granulaciones centrales.
2. Extracitoplasmáticas: Morfología del primer corpúsculo polar, tamaño y granulación del espacio perivitelino, decoloraciones y defectos de estructura de la zona pelúcida.

Considerando las consecuencias posteriores, parece que el dismorfismo con peores consecuencias sería la acumulación de Retículo Endoplásmico sobre la superficie citoplasmática (47, 48, 49).

Algunos de los dismorfismos ovocitarios citados, están relacionados con la edad del ovocito.

2.2.2 Morfología del cigoto.

El chequeo de la fecundación debe ser preciso y claro. Un ovocito fecundado debe tener dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. La fecundación se evalúa entre las 16 y 18 horas post-inseminación, pues en la mayoría de los ovocitos, los dos pronúcleos son visibles entre las 17 y las 20 horas posteriores a la inseminación.

Normalmente, la aparición de los pronúcleos tras la ICSI ocurre entre 3 y 13 horas después de la microinyección, mientras que en el caso de la fecundación *in vitro* convencional, este tiempo aumenta ligeramente, apareciendo los pronúcleos entre 8 y 14 horas después de la inseminación.

Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de los dos corpúsculos polares, que pueden haberse fragmentado o degenerado antes de la evaluación, y esta circunstancia podría dar lugar a equívocos.

También es resaltable la valoración de la singamia 24 horas post-inseminación como un control de calidad de la maduración ovocitaria.

En cuanto al tiempo relativo a la primera división celular, algunos autores lo relacionan con la calidad embrionaria y la implantación (50, 51, (13). Además, aquellos embriones que presentan una división temprana y simétrica han sido correlacionados con menor número de anomalías cromosómicas (52).

Sin embargo, tienen peor pronóstico aquellos embriones con división anterior a 20 horas post-inseminación. La observación inicial puede ser también utilizada para preseleccionar negativamente embriones que se dividen directamente en tres o más células, puesto que han sido correlacionados con mayor incidencia de anomalías cromosómicas (53).

La observación en tiempos precisos es una herramienta muy útil de cara a evaluar la capacidad y la precisión en las divisiones así como para filtrar aquellos embriones subóptimos, y el uso de la tecnología *time lapse* nos ayuda en este aspecto.

El valor predictivo de la morfología pronuclear ha sido objeto de debate entre autores. Algunos han visto su efecto positivo (11, 54). Otros han observado su correlación con aneuploidías (55, 56) y finalmente otros autores no han encontrado relación entre la morfología pronuclear y el potencial de implantación (57, 58).

Los pronúcleos deben ser similares, yuxtapuestos y con localización central en el ovocito fecundado. El patrón pronuclear tiene en cuenta la simetría y la alineación de los pronúcleos e implica el chequeo del número y posición relativa de los nucléolos.

En relación a los nucléolos, idealmente debería de haber entre 5 y 7 nucléolos dentro de cada pronúcleo, con similar distribución entre ambos.

Una distribución desigual de los nucléolos, o un número inadecuado, arrojan un mal pronóstico, y por eso es importante tener en cuenta la valoración de la morfología pronuclear en la rutina del laboratorio.

2.2.3 Morfología del embrión en día 2 y 3 de desarrollo.

2.2.3.1 Número de células.

Teóricamente, en el día 2 de desarrollo se produciría la primera división embrionaria en la que el cigoto se dividiría en dos células de igual tamaño que, al volver a dividirse, formarían un embrión de 4 células. La siguiente división mitótica, es decir, el paso de un embrión de 4 a 8 células, ocurriría en el día 3 de desarrollo.

2.2.3.2 Fragmentación.

Un fragmento es una estructura citoplasmática extracelular rodeada por una membrana y sin núcleo en su interior. La incidencia de fragmentación es difícil de evaluar, puesto que es necesario diferenciar los fragmentos de las células y posteriormente la proporción relativa en el embrión.

INTRODUCCIÓN

Algunos autores (59), definieron los fragmentos como células con $<45\mu\text{m}$ de diámetro, en embriones de día 2, y $<40\mu\text{m}$ de diámetro en día 3.

El impacto de una fragmentación $<10\%$ en embriones de día 3 parece ser ínfimo (60). También se ha encontrado una tendencia entre el grado de fragmentación y la incidencia de aneuploidías (61).

2.2.3.3 Multinucleación.

Se define multinucleación como la presencia de más de un núcleo en interfase dentro de una célula. La presencia de multinucleación se considera anormal tanto en embriones *in vivo* (62) como *in vitro* (63).

El grado de multinucleación varía mucho por cohorte embrionaria obtenida tras un tratamiento de reproducción asistida. Autores como Balakier (64), observaron que al menos el 44% de las pacientes tenía por lo menos un embrión con multinucleación, mientras que otros autores (65, 66), observaron una incidencia de multinucleación por encima del 87% en los ciclos (referido a tratamientos de fecundación *in vitro*), donde el 31-33% de los embriones estaban afectados.

Algunos de los factores que influyen en la multinucleación son el medio de cultivo (67) y un inadecuado control de la temperatura durante la extracción de los ovocitos (63).

Los diferentes mecanismos que originan la multinucleación son:

1. Cariocinesis sin citocinesis.
2. Fragmentación parcial del núcleo.
3. Defectos en la migración de los cromosomas durante la anafase mitótica.

Está bien documentado que la multinucleación está correlacionada con un alto grado de aberraciones cromosómicas (68), así como también con un desarrollo asimétrico de los embriones (52).

La transferencia de embriones con células multinucleadas conduce a menores tasas de gestación, implantación y recién nacidos vivos, (66, 52).

El criterio de valoración de la multinucleación entre laboratorios es variable dependiendo de un buen número de factores, incluyendo la posibilidad de cultivo hasta blastocisto.

2.2.3.4 Simetría y Velocidad de Desarrollo.

2.2.3.4.1 Simetría.

La asimetría es un fenómeno muy común en los embriones humanos in vitro. Múltiples estudios han observado este fenómeno, siendo el primero en hacerlo Puissant, (71), quien definió como un embrión asimétrico aquel entre cuyas células existe una diferencia de tamaño de al menos un tercio. Más tarde, la presencia de asimetría y su impacto negativo sobre las tasas de gestación evolutivas ha sido confirmado por varios autores (72, 73).

El análisis genético de las células procedentes de embriones asimétricos ha sido correlacionado con multinucleación y mayor proporción de aberraciones cromosómicas (52). Esto podría deberse a una distribución desigual de proteínas, de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y de mitocondrias que influirían negativamente sobre ciertas proteínas y genes, tanto en ovocitos como en embriones.

2.2.3.4.2 Velocidad de desarrollo.

Es el único y más simple factor predictivo en cuanto a viabilidad embrionaria.

Numerosos autores han descrito que tanto un desarrollo lento como demasiado rápido tiene un efecto negativo sobre las tasas de implantación (72, 73, 74, 75).

También se ha establecido una correlación entre un número normal de células y la constitución cromosómica (76, 77).

2.3 Morfología embrionaria (IVI).

Los principales parámetros morfológicos que se evalúan de rutina en el laboratorio del Instituto Valenciano de Infertilidad, así como en la mayoría de laboratorios del mundo, son los que nos permiten hacer una buena selección embrionaria en busca del embrión con mayor potencial de implantación y mayores posibilidades de dar lugar a una gestación evolutiva.

Todos los parámetros utilizados son consensuados siguiendo las recomendaciones del grupo de interés en embriología (GIE) de la ESHRE y de ASEBIR y ya han sido ya nombrados y descritos en la presente tesis (patrón pronuclear, número de células, fragmentación, multinucleación, simetría y velocidad de desarrollo).

3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.

3.1 Definición.

El diagnóstico genético preimplantacional es una técnica de diagnóstico muy precoz que, gracias a la combinación de las técnicas de fecundación in vitro y las técnicas de biología molecular, permite detectar anomalías cromosómicas y genéticas en una única célula embrionaria antes de la transferencia al útero y por tanto, antes de que tenga lugar la implantación (78). Esta aproximación diagnóstica es de gran utilidad en parejas con elevado riesgo de transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia, y para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, evitando la aplicación de interrupciones voluntarias del embarazo.

Según el tipo de diagnóstico, las técnicas moleculares que se pueden utilizar son:

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
2. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
3. Arrays de CGH (hibridación genómica comparada).

Esta técnica de diagnóstico se puede aplicar en diferentes estadios del desarrollo embrionario, pudiéndose analizar los corpúsculos polares ovocitarios, las células de embriones en día 3 de desarrollo, así como las células procedentes del trofoectodermo en embriones en estadio de blastocisto. Aunque la Ley de Reproducción Humana Asistida es distinta en cada país, en España se permite realizar el análisis genético en cualquiera de estos tres estadios embrionarios, siendo el día 3 de desarrollo el más extendido hasta la actualidad. Según el análisis realizado, el diagnóstico se puede obtener entre las 2 horas y las 48 horas posteriores a la biopsia embrionaria, lo que permite realizar la transferencia de embriones cromosómicamente normales en el día 5 de desarrollo embrionario, generalmente en estadio de blastocisto.

3.2 Indicaciones.

3.2.1 Herencia ligada a los cromosomas sexuales.

Se han descrito más de 300 enfermedades (hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, distrofia de Becker, síndrome de Hunter, síndrome de Lowe, etc.), cuyo patrón de transmisión va ligado a los cromosomas sexuales.

En la actualidad, en muchos casos, existe una clara asociación entre alteración de un gen (o *locus*) y la manifestación de una determinada enfermedad, lo que ofrece la posibilidad de identificar la mutación mediante técnicas de secuenciación, PCR, etc.

Sin embargo, en otras ocasiones se desconoce la localización exacta del gen responsable de la enfermedad, o aunque se conozca su localización, no es posible un diagnóstico basado en estudios con marcadores polimórficos entre los alelos de la pareja por no ser posible la identificación de la mutación o la informatividad de dichos marcadores.

En estos casos, si el gen causante del trastorno tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X, con carácter recesivo, contamos con la posibilidad de seleccionar el sexo del embrión mediante FISH con el fin de evitar la transmisión de la enfermedad a la descendencia.

3.2.2 Alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales.

La identificación de los cromosomas sexuales permite además el estudio de alteraciones numéricas de estos cromosomas en la descendencia de pacientes con síndrome de Klinefelter (XXY), síndrome XYY, síndrome de Turner (X0) y trisomía X, con mayor incidencia en parejas que se someten a un tratamiento de fertilidad (79). El análisis se realiza también mediante FISH y se pueden seleccionar embriones con un número correcto de copias para los cromosomas sexuales (80, 81).

3.2.3 Estudio de aneuploidías en pacientes de mal pronóstico.

En los últimos años, el DGP se ha aplicado también como una herramienta adicional, para la selección de embriones, en varios grupos de pacientes, consideradas como de mal pronóstico dentro de los programas de FIV. En estos casos se ha denominado *Preimplantational Genetic Screening* (PGS), es decir, cribado genético preimplantacional. El PGS está indicado principalmente en mujeres de edad avanzada (≥ 38 años), en casos de fallo repetido de implantación tras FIV (≥ 3 fallos previos), en parejas con aborto recurrente de causa desconocida (> 2 abortos previos) y en parejas con factor masculino severo.

3.2.3.1 Edad materna avanzada.

Las pacientes de edad avanzada presentan una alta incidencia de aneuploidías ovocitarias debido a defectos en el proceso de reducción meiótica, por lo que presentan un riesgo mayor de aneuploidías en la descendencia, en concreto para los cromosomas 13, 18 y 21 (82), y de abortos espontáneos (83). Los estudios realizados en embriones preimplantatorios también muestran un aumento de aneuploidías relacionado con la edad materna (84). Algunos autores han propuesto la selección de embriones normales para mejorar las tasas de implantación, reducir la tasa de aborto y evitar el riesgo de descendencia afectada por cromosomopatías (18, 85). La

selección de embriones normales a través del PGS, en este grupo de pacientes, nos permitiría normalizar sus tasas de gestación, aunque la principal aportación del tratamiento sería conseguir que sean gestaciones evolutivas con nacimientos de niños sanos.

3.2.3.2 Parejas con fallo repetido de implantación.

En pacientes que se someten a un ciclo de FIV, se define fallo repetido de implantación como parejas con tres o más intentos sin éxito, o tras la transferencia de 10 o más embriones de buena calidad sin conseguir gestación. Las causas del fallo de implantación pueden ser múltiples y están poco definidas, y podrían estar implicados tanto factores endometriales como factores embrionarios. Entre ellas podríamos destacar: defectos en el diálogo embrión-endometrio, efecto negativo de los protocolos de estimulación, malformaciones uterinas, defectos inmunológicos, anomalías en los genes implicados en la implantación y problemas relacionados con el embrión. En relación al último aspecto, se ha sugerido que las anomalías cromosómicas embrionarias podrían ser responsables del fallo de implantación en algunas de estas parejas (86).

3.2.3.3 Parejas con aborto de repetición de causa desconocida.

Basados en la alta frecuencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos, principalmente alteraciones numéricas de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y, y en la elevada incidencia de parejas con aborto de repetición en las que no se consigue identificar el origen de los abortos, se comenzó a realizar PGS en parejas con dos o más abortos previos en las que se habían descartado otros factores, y cuyo cariotipo, en ambos miembros de la pareja, fuera normal. La finalidad del PGS, en este grupo de pacientes, es la de poder seleccionar embriones normales para los cromosomas analizados y con ello mejorar las posibilidades de conseguir una gestación a término (17, 87, 88).

En nuestro programa de DGP, se identificaron subgrupos de pacientes en las que el beneficio de aplicar esta técnica era más evidente, como parejas con anomalías citogenéticas en abortos anteriores, o que hubieran tenido entre 2 y 5 abortos previos (89).

3.2.3.4 Parejas con factor masculino severo.

Los estudios de diagnóstico prenatal en gestaciones de ICSI, conseguidas con espermatozoides de testículo, han mostrado mayores porcentajes de cariotipos anormales *de novo*, afectando principalmente a los cromosomas sexuales (90, 91). Además, los varones con oligozoospermia severa y con azoospermia secretora presentan una elevada incidencia de alteraciones en la meiosis, reflejándose en un incremento de espermatozoides cromosómicamente anormales tras estudios de FISH. La realización del PGS, en los ciclos de FIV de parejas con factor masculino severo, reveló un elevado porcentaje de embriones con alteraciones cromosómicas numéricas, especialmente para los cromosomas sexuales, así como de mosaicismo (92, 93), obteniéndose además una correlación entre las anomalías cromosómicas observadas en los espermatozoides y las alteraciones presentes en los embriones (94).

En nuestro programa, el PGS ofrece elevadas tasas de embarazo en pacientes con factor masculino severo, sin embargo, la tasa de aborto sigue siendo elevada en pacientes con azoospermia secretora. Por ello, serían necesarios más estudios para definir si la aplicación del PGS en el factor masculino severo realmente beneficia el pronóstico reproductivo de estas parejas en todos los subgrupos de factor masculino.

OBJETIVOS

II OBJETIVOS

1 Objetivo principal.

Evaluarla posible correlación entre la morfología del embrión en día 3 de desarrollo y sus anomalías cromosómicas, mediante la elaboración de un modelo predictivo que pudiera resultar de utilidad clínica.

2 Objetivos secundarios.

2.1. Evaluar la correlación entre la morfología del embrión en los días 4 y 5 de desarrollo, en estadio de mórula y blastocisto, y sus anomalías cromosómicas mediante la elaboración de modelos predictivos.

2.2. Evaluar la correlación entre la morfología del embrión, sus anomalías cromosómicas y su tasa de implantación dentro del programa de diagnóstico genético preimplantacional, una vez conocida su condición euploide.

MATERIAL Y METODOS

III MATERIAL Y MÉTODOS

1 TIPO DE ESTUDIO. PACIENTES Y CARACTERÍSTICAS.

Los datos analizados en esta tesis corresponden a un estudio retrospectivo que incluyó 1920 pacientes y 8262 embriones del programa de diagnóstico genético preimplantacional del Instituto Valenciano de Infertilidad-IVI Valencia entre enero de 2000 y mayo de 2007.

Todos los ciclos de DGP tuvieron lugar en las instalaciones de la clínica, y todas las pacientes firmaron los consentimientos requeridos por la Ley de Reproducción asistida previamente a la realización de cualquier procedimiento.

Las indicaciones para realizar el DGP fueron:

1. Edad materna avanzada (≥ 38 años).
2. Fallo repetido de implantación (≥ 3).
3. Aborto de repetición (≥ 2).
4. Factor masculino severo.
5. Gestación previa con cromosomopatía.

2 CULTIVO EMBRIONARIO.

Los ovocitos que se han fecundado de forma correcta, deben continuar su crecimiento en el laboratorio hasta el momento de su transferencia al útero. El método de cultivo embrionario, es decir, la forma en que van a ser cultivados los embriones, así como el estadio en el que se realiza la transferencia admite variaciones.

En el caso del cultivo prolongado, los embriones van a estar en el laboratorio hasta el día 5-6 de desarrollo por lo que debemos cultivarlos en las condiciones más óptimas para no influir negativamente en su desarrollo hasta el estadio de blastocisto.

Independientemente del sistema que se escoja para el cultivo de los embriones, éste debe ser capaz de mantener estables los parámetros de pH, osmolaridad y temperatura necesarios para su viabilidad durante el crecimiento en el laboratorio.

En la presente tesis, el método de elección para el cultivo hasta blastocisto dentro del programa de DGP fue por defecto el cocultivo, y solo la ausencia de placas cultivadas con células justificó el empleo del cultivo secuencial estándar.

2.1 Cultivo estándar.

Las condiciones de cultivo convencionales inducen un considerable nivel de estrés. Hoy en día existen muchos medios de cultivo diseñados especialmente para proporcionar el ambiente idóneo para conseguir fecundación tras la inseminación de los ovocitos, y permitir el desarrollo de los embriones hasta su transferencia. Durante el cultivo, el embriólogo/a debe controlar todos los parámetros que se alejan de lo que se consideraría un crecimiento óptimo, como ritmos de división lenta, bloqueos en el desarrollo embrionario, anomalías citoplasmáticas, posibles contaminaciones, etc.

En el caso de las pacientes del programa de DGP englobadas en la presente tesis cuyo método de cultivo de elección hasta blastocisto fue el secuencial estándar, las placas utilizadas desde la fecundación hasta el día 3 de desarrollo fueron las de Petri (150270 Nunc ®) de 60milímetros de diámetro con base hidrofóbica. Los embriones fueron incubados en gotas de 50 µl de medio de cultivo (IVF® Vitrolife) con tres gotas de 100µl del mismo medio para lavar los mismos, todo ello cubierto con aceite mineral Global®. A partir del día 3 y hasta el día 5, los embriones se cultivaron individualmente después de la biopsia en placas de 24 pocillos (353047 Falcon®) con 600 µl de medio (CCM® Vitrolife).

2.2 Cocultivo.

Existe otro método de cultivo consistente en la incubación de los embriones en presencia de otras células, llamadas *feeder*, para ayudar al desarrollo embrionario por las propiedades de detoxificación, aportación de citoquinas y secreción al medio de cultivo de factores de crecimiento, hasta que estos alcanzan el estadio de blastocisto. Esta técnica se denomina cocultivo (Figura 4).

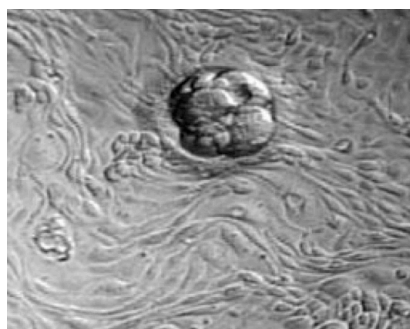


Figura 4: Imagen de un embrión humano cocultivado sobre una monocapa de células epiteliales endometriales³

Existe la posibilidad de utilizar dos tipos celulares diferentes para formar la monocapa: tejido embrionario (trofoblasto), para ayudar al embrión a través de un efecto autocrino, y células del tracto genital femenino para asistir al embrión mediante un efecto paracrino.

En la presente tesis, los embriones, después de ser biopsiados, fueron cocultivados sobre una monocapa de células del epitelio endometrial humano. El tejido endometrial fue extraído de mujeres donantes testadas según los requisitos pautados por la ley de reproducción asistida.

Para preparar el medio de cultivo endometrial se empleó:

- Colagenasa tipo IA (Sigma® Aldrich Química).
- Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma® Aldrich Química).

³ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

MATERIAL Y MÉTODOS

- MCDB-105 (Sigma® Aldrich Química).
- Fungizona (Gibco® BRL).
- Gentamicina (Gibco® BRL).
- Albúmina sérica humana (HSA® Vitrolife).
- Agua para transferencia de embriones (Sigma® Aldrich Química).
- Insulina (Sigma® Aldrich Química).

La biopsia endometrial se colocó en un tubo cónico (352057 Falcon®) junto con medio DMEM al que se le añadió 200 µl de fungizona y 200 µl de gentamicina, y se manipuló en cabina de flujo laminar Ksystem®.

Se limpió de moco y coágulos y se practicaron varios pases por placas Petri de 10 centímetros de diámetro (351029 Falcon®) junto con DMEM y collagenasa.

Se troceó con dos bisturís en trozos pequeños de aproximadamente 1 mm². Este tejido limpio y troceado se colocó en un tubo cónico con el 0.1% de collagenasa y se tapó con Parafilm®.

Este tubo se colocó en posición horizontal durante una hora en un baño (Pselecta®) a 37°grados centígrados y con movimiento 75 U/minuto.

Pasado ese tiempo se colocó el tubo en una gradilla en posición vertical en la cabina de flujo durante 10 minutos. Tras ese período, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet*.

Se dejó sedimentar 5 minutos y se volvió a descartar el sobrenadante, y así hasta tres veces.

Se resuspendió el último *pellet* del tubo cónico con 3-5 ml de albúmina sérica humana (HSA® Vitrolife) al 1%.

Se trasladó todo el volumen a un frasco de cultivo de 25 cm² (353813 Falcon®) y se incubó 15 minutos en el incubador Heraeus®.

Se colocó 3 ml de HSA al 1% en otro frasco de 25 cm² y se recogió el sobrenadante del primer frasco pasándolo al segundo. Se incubó de nuevo 15 minutos.

Se recogió de nuevo el sobrenadante y se pasó a un tubo cónico donde se midió el volumen.

En la placa de 24 pocillos (353047 Falcon®) se añadieron por pocillo 800 µl de medio para el cultivo endometrial y 200 µl del medio con células en suspensión. Después se introdujo en el incubador.

El medio de cultivo se cambió cada dos o tres días durante una media de 12 días, hasta que la placa fue empleada para el cultivo de los embriones en día 3 después de la biopsia embrionaria

Los embriones tras la biopsia se cocultivaron de manera individual en los pocillos de la placa de 24 pocillos donde fue sembrada la monocapa, en un volumen de 600 µl de medio de cultivo (CCM® Vitrolife) hasta el momento de la transferencia, normalmente en día 5 de desarrollo.

El cocultivo favorece el desarrollo embrionario y este beneficio puede ser debido, más que a los factores embriotróficos secretados, al contacto entre el embrión y la monocapa y a la eliminación de componentes perjudiciales del medio.

Se ha observado que los embriones cocultivados poseen menor fragmentación y mayor número de células que aquellos que son cultivados solo con medio. Durante este cultivo prolongado del embrión en el laboratorio, se produce una autoselección que nos ayuda a decidir qué embriones son los mejores para la transferencia embrionaria, aunque en el caso de nuestro estudio, la elección estuvo condicionada a la euploidía de los embriones, y una vez conocida ésta, en el caso de disponer de varios, la morfología de los mismos primó para la transferencia.

2.3 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados durante la realización de la presente tesis, fueron los establecidos por la rutina del laboratorio de FIV del IVI Valencia con las modificaciones adaptadas al programa de DGP que se detallan a continuación.

En día 2 de desarrollo se utilizó el medio comercial IVF® Vitrolife y CCM® Vitrolife en proporción 1:1. A partir del día 3 y hasta día 5 se utilizó exclusivamente CCM®. Para la transferencia embrionaria también se utilizó el medio CCM®.

3 PARÁMETROS DE MORFOLOGÍA.

No todos los embriones obtenidos en el laboratorio de fecundación *in vitro* presentan unas características morfológicas compatibles con la viabilidad. Únicamente los embriones morfológicamente adecuados son seleccionados para transferencia o crioconservación. La elección del embrión con la mayor capacidad posible de implantación para ser transferido a la futura madre es la principal finalidad de la selección embrionaria.

La clasificación que se hizo de los embriones del presente estudio en relación a su potencial de implantación fue la siguiente:

1. Óptimos

Son los que tienen un desarrollo correcto y ninguna característica de mal pronóstico. Estos embriones serán siempre transferidos o crioconservados. También nos referimos a ellos como embriones de buena calidad. En pacientes de buen pronóstico, estos embriones suelen tener un 50% o más de probabilidad de implantar.

2. Subóptimos

Son los embriones que presentan una serie de características que si bien van asociadas a una menor viabilidad no son completamente descartables. Los transferiremos si no contamos con ninguno de mejor

morfología. De la misma manera, procederemos a crioconservarlos si existen otros embriones óptimos en la misma cohorte que van a ser transferidos. Si no es así, podemos dejarlos en observación hasta su quinto o sexto día de desarrollo y crioconservarlos si alcanzan el estadio de blastocisto. Estos embriones suelen tener algo menos de la mitad de probabilidad de implantar (20–25%), aunque siempre dependerá de la calidad final que presenten.

3. No viables

Son los que serán descartados completamente. Incluyen tanto los embriones evolutivos *in vitro* cuyas características están relacionadas con una falta de potencial de implantación, como los que están bloqueados. Obviamente esta clasificación es subjetiva y para catalogar un embrión como no viable, debe estar contrastado con la experiencia de cada laboratorio, pero se estima su potencial de implantación en menos del 1%.

3.1 Morfología espermática.

Las características macroscópicas que evaluamos en nuestro estudio respecto a la muestra espermática fueron el aspecto, la licuefacción, la viscosidad del pH y el volumen, mientras que las características microscópicas comprendieron la movilidad espermática, la concentración, la vitalidad, la presencia de detritos u otros elementos celulares del eyaculado, la aglutinación entre espermatozoides y la morfología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona unos valores de referencia como puntos de corte.

- Volumen: 1,5 ml
- Concentración espermática: 15 millones/ml
- Número total de espermatozoides: 39 millones/eyaculado
- Movilidad espermática: 32% móviles progresivos.
- Vitalidad: 58% vivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Morfología: >4%.

La nomenclatura de los parámetros seminales comprende:

- Normozoospermia: Todos los parámetros dentro de los valores de referencia.

- Oligozoospermia: Número total de espermatozoides por debajo del número de espermatozoides de referencia.

- Astenozoospermia: Número de espermatozoides móviles progresivos por debajo de los valores de referencia.

Teratozoospermia: Número de espermatozoides con morfología normal por debajo de los valores de referencia.

- Azoospermia: Ausencia de espermatozoides.

- Criptozoospermia: Concentración espermática por debajo de 100.000 espermatozoides/ml.

- Aspermia: Ausencia de semen.

- Hemospermia: Presencia de eritrocitos en el eyaculado.

- Leucospermia: Presencia de leucocitos, en el eyaculado, por encima del umbral establecido.

- Necrozoospermia: Bajo porcentaje de espermatozoides vivos y alto porcentaje de espermatozoides inmóviles en el eyaculado.

- Hipospermia: Volumen seminal por debajo de los valores de referencia.

3.2 Morfología embrionaria.

La evaluación embrionaria se puede efectuar de manera diferente dependiendo del laboratorio. En el IVI Valencia, se establece una relación de las características del embrión, de tal manera que su comparación, junto con la experiencia del embriólogo/a, es la que nos llevará a decidir cuál es el mejor embrión para transferir. Además, como ya hemos visto en la introducción,

ASEBIR ha definido una propuesta de criterios morfológicos de variación de la calidad y su clasificación en escalas para cada uno de los diversos estadios embrionarios.

Los embriones se observaron en un microscopio invertido (YX71 Olympus®) a 400 aumentos, con un objetivo de contraste modular y pletina calefactada Tokai®. Para comprobar la evolución, se realizaron observaciones cada 24 horas. Muchas características en el tercer día de desarrollo embrionario *in vitro* se interpretan en función del aspecto en el segundo día de desarrollo embrionario *in vitro*.

3.2.1 Morfología del cigoto, patrón pronuclear.

La morfología de los pronúcleos se correlaciona con la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*. Está relacionada con la calidad de los gametos y es el primer control del desarrollo.

Un cigoto correctamente fecundado es el que presenta dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. Los cigotos se clasificarán en distintos grupos según el tamaño pronuclear, los cuerpos precursores de nucléolos (CPN) y la presencia o ausencia de halo citoplasmático (Figura 5). Los distintos patrones pronucleares son (Figura 6):

1. Grupo I: De tres a siete CPN polarizados y sincrónicos, y con tres o menos de tres CPN de diferencia entre los dos pronúcleos.
2. Grupo II: De siete a diez CPN dispersos y sincrónicos.
3. Grupo III: Alguno de los dos pronúcleos o ambos, tiene uno o dos CPN.
4. Grupo IV: Cualquier otra combinación como por ejemplo: más de siete CPN polarizados o menos de siete sin polarizar, polarización asincrónica (un pronúcleo polarizado y el otro no), más de tres CPN de diferencia entre los dos pronúcleos, etc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Respecto a la simetría pronuclear, se definen tres tipos:

1. Tipo 1: Pronúcleos del mismo tamaño.
2. Tipo 2: Pronúcleos de distinto tamaño, pero similar.
3. Tipo 3: Pronúcleos de distinto tamaño.



Figura 5: Cigoto correctamente fecundado.⁴

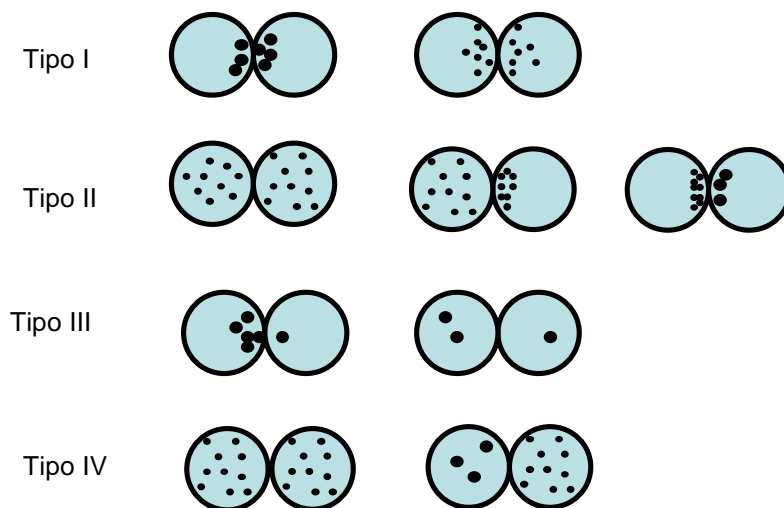


Figura 6: Patrones pronucleares⁵.

⁴ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

⁵ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

3.2.2 Número de células.

Establecimos una clasificación embrionaria en función del número de células que presentaron los embriones en un momento determinado del desarrollo. Óptimos fueron aquellos que en día dos tuvieron entre 2 y 5 células y en día tres entre 6 y 10 células. Fueron considerados subóptimos aquellos que en día dos tenían 6 o más células y en día tres menos de 6 o más de 10 células. Por último, fueron embriones no viables aquellos que estaban bloqueados en día dos o día tres y los que tenían menos de 4 células en día tres.

3.2.3 Fragmentación.

Además del número de células, la fragmentación es el parámetro más importante en la evaluación de la viabilidad de un embrión. Se cuantifica como el porcentaje del volumen que ocupa.

Dentro del parámetro fragmentación, se tuvieron en cuenta dos aspectos:

1. Porcentaje de fragmentación:

Cantidad de fragmentos respecto al volumen total del embrión.

En este estudio consideramos que los embriones fueron:

- a. Embriones óptimos: Cuando presentaron menos del 20% de fragmentación.
- b. Embriones subóptimos: Entre un 20-40% de fragmentación.
- c. Embriones no viables: Más de un 50% de fragmentación.

2. Tipo de fragmentación (Figura 7):

Indica la distribución de los fragmentos:

- a. Tipo I: Menos del 5% de fragmentación asociado a una única célula.

- b. Tipo II: Fragmentos localizados, que corresponden a la fragmentación total o parcial de una célula.
- c. Tipo III: Fragmentos pequeños distribuidos por todo el embrión
- d. Tipo IV: Fragmentos grandes distribuidos por todo el embrión, pueden confundirse con células.

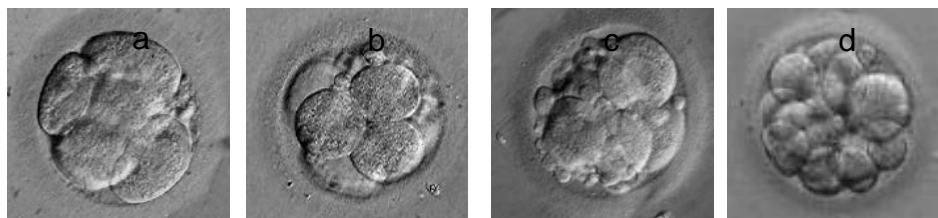


Figura 7: Tipo de fragmentación. a) tipo I b) tipo II c) tipo III d) tipo IV⁶.

3.2.4 Simetría.

Consideramos en este estudio y en relación a la simetría, que en el embrión morfológicamente óptimo la forma de las células va variando desde la esfera inicial del cigoto a la forma elipsoide del estadio de 8 células. Se considera adecuada una distribución regular del volumen celular de tal manera que todas las células tengan un tamaño similar en embriones con un número par de células, lo que se considera como una simetría normal. En los embriones con número impar de células, es lógico encontrar una relativa asimetría, por lo que en este caso se considera asimétrico si presenta todas exactamente del mismo tamaño. Así pues nos encontramos con distintos tipos de simetría (Figura 8):

1. Embriones óptimos (simetría 1): Son aquellos cuyas células tienen un tamaño similar con un número par de células y tienen relativa asimetría en embriones con un número impar de células.

⁶ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

2. Embriones óptimos (simetría 2): Son aquellos cuyas células tienen ligera asimetría.
3. Embriones subóptimos (simetría 3): Son aquellos cuyas células tienen bastante asimetría (diferencias de hasta el 20% del volumen).
4. Embriones anormales (simetría 4): son aquellos en los que existe una célula dominante que ocupa una tercera parte o más del volumen del embrión o una diferencia mayor del 25% entre la célula más grande y la más pequeña.



Figura 8: Simetría embrionaria. a) simetría tipo1 b) simetría tipo2 c) simetría tipo 3 d) simetría tipo 4⁷.

3.2.5 Multinucleación.

Los embriones humanos muestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, células multinucleadas (Figura 9).

Hicimos especial hincapié en anotar el número de células multinucleadas y el número de núcleos por célula, distinguiendo entre binucleación (2 núcleos por célula), multinucleación (más de 2 núcleos por célula) o micronucleación (presencia de micronúcleos).

Según la presencia o no de multinucleación en los embriones, los clasificamos como:

⁷ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

1. Embriones óptimos: Son aquellos en los que se observa un único núcleo en todas las células o no se observa núcleo en las células (célula en interfase, núcleos no visibles).
2. Embriones subóptimos: Son aquellos que presentan más de un 25% de células multinucleadas. La presencia de células multinucleadas en día 2 y día 3 de desarrollo se relaciona con una menor tasa de implantación y desarrollo embrionario hasta blastocisto. Estos embriones suelen ser mosaicos o aneuploides. La aparición de células multinucleadas sólo en día 3 de desarrollo no parece afectar tanto a su capacidad de implantación.



Figura 9: Multinucleación. a) normal b) multinucleado.⁸

3.2.6 Contacto intercelular y compactación.

En algunas ocasiones, pudimos observar embriones en los que las células presentaban muy pocas zonas de contacto entre ellas.

Los embriones con PCA (*poor cell adherence*) presentan células libres y muy esféricas con pocas o ninguna zona de contacto entre sí. Estos embriones tienen mal pronóstico y pueden llegar a bloquearse. Algunos embriones poseen una compactación localizada o regional, lo cual demuestra una asincronía entre las células. Según el tipo de compactación, los embriones fueron clasificados en 4 grados (Figura10):

0. Embriones cuyas células no presentan ningún tipo de compactación.

⁸ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

1. Embriones que empiezan a compactarse, las células aún son identificables y las membranas entre ellas están adyacentes.
2. Embriones compactados, es difícil diferenciar unas células de otras.
- 3: Embriones muy compactados, no se pueden diferenciar las células.



Figura 10: Compactación. a) grado 0 b) grado 1 c) grado 2 d) grado 3.⁹

3.3 Morfología del blastocisto.

En el quinto día de desarrollo, después de la compactación celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocelo y se produce la diferenciación celular. Esta nueva morfología del embrión recibe el nombre de blastocisto y para su valoración existen varios criterios:

3.3.1 Según su evolución.

Podemos encontrar cinco categorías (Figura 11):

1. Blastocisto temprano (BT): Comienza a formarse la cavidad y empieza la diferenciación celular.
2. Blastocisto cavitado (BC): El blastocelo ocupa más del 50% del volumen del embrión.
3. Blastocisto expandido (BE): Se observa el blastocelo rodeado por una monocapa celular o trofotodermo, que formará la placenta, y una masa celular interna que dará lugar al embrión. Con la

⁹ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

expansión del embrión se produce un aumento del volumen y una disminución del grosor de la zona pelúcida.

4. Blastocisto en eclosión o *hatching* (BHi): El blastocisto comienza a salir a través de la zona pelúcida.
5. Blastocisto eclosionado o *hatched* (BH): El blastocisto está completamente fuera de la zona pelúcida. La eclosión podría explicarse por un mecanismo mecánico (el blastocisto se expande y se contrae ejerciendo presión sobre la zona pelúcida y debilitándola) o químico (mediante la secreción de proteasas para digerir la zona pelúcida).



Figura 11: Clasificación de blastocistos según evolución. a) blastocisto temprano, b) blastocisto cavitado, c) blastocisto expandido, d) blastocisto iniciando *hatching*, e) blastocisto *hatched*.¹⁰

3.3.2 Según el tipo de masa celular interna (MCI).

Podemos encontrar cuatro categorías (Figura 12):

1. Tipo A: Compacta, muchas células, bien definida.
2. Tipo B: Bastantes células agrupadas y de aspecto laxo.
3. Tipo C: Muy pocas células.
4. Tipo D: Ausente o degenerada.

¹⁰ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

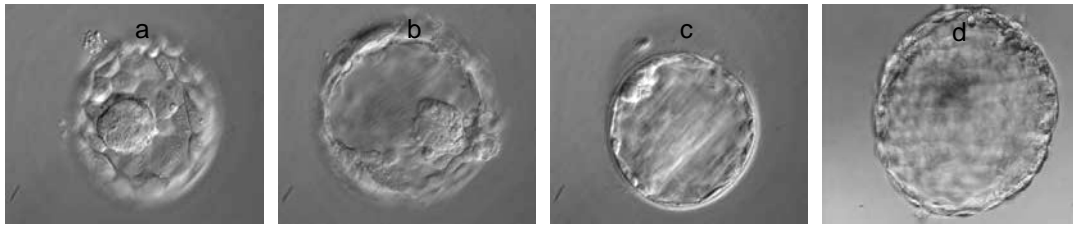


Figura 12: Clasificación de blastocistos según tipo de masa celular interna (MCI). a) tipo A, b) tipo B, c) tipo C, d) tipo D

3.3.3 Según el tipo de trofoblasto (TE).

Podemos encontrar cuatro categorías (Figura 13):

1. Tipo A: Completo, formado por muchas células.
2. Tipo B: Incompleto, alguna zona lineal.
3. Tipo C: Muy pocas células.
4. Tipo D: Liso o degenerado.

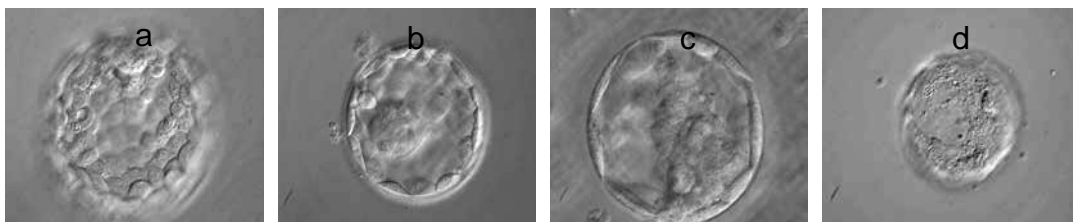


Figura 13: Clasificación de blastocistos según el tipo de trofoblasto (TE). a) tipo A b) tipo B, c) tipo C, d) tipo D¹¹

4 ESTIMULACIÓN.

Las pacientes del programa de DGP de IVI Valencia, fueron estimuladas según los protocolos de estimulación ovárica controlada (EOC) empleados de rutina por los ginecólogos/as en la consulta.

¹¹ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

MATERIAL Y MÉTODOS

Los protocolos de estimulación fueron personalizados para cada paciente, en función de su etiología, o determinados factores como la edad materna, para obtener los mejores resultados. Los fármacos empleados fueron:

1. FSH (hormona folículo estimulante).
2. LH (hormona luteinizante).
3. HMG (gonadotropina menopáusica humana).
4. Agonista de GnRH.
5. Antagonista de GnRH.
6. Ovitrelle® (gonadotropina coriónica humana).

Se realizaron ecografías periódicas en cada paciente para controlar el crecimiento folicular y se complementaron con análisis de los niveles de estradiol y progesterona durante la estimulación y previos a la punción ovárica.

5 PUNCIÓN OVOCITARIA.

La recuperación de los ovocitos, también denominada punción ovocitaria, consiste en la obtención de los ovocitos que se encuentran dentro de los folículos del ovario.

La punción se realizó mediante la ayuda de ecografía vaginal que permite observar los folículos en los ovarios. Para la obtención de los ovocitos, se utilizó un transductor vaginal (Voluson®) que lleva acoplada una aguja especialmente diseñada para perforar los folículos del ovario y aspirar el líquido folicular junto con el ovocito de su interior. Esta aguja va unida a un aspirador eléctrico Labotec® que le confiere la presión negativa necesaria para aspirar el contenido de los folículos sin dañar los ovocitos. El contenido del líquido folicular junto aspirado pasa directamente a un tubo a través del sistema conectado a la aguja de punción.

El material empleado para la punción fue el siguiente:

- Cabina de flujo laminar calefactada (KSystem®, Dinamarca).
- Lupa estereoscópica (Olympus®, Japón).
- Mesa calefactada (KSystem®, Dinamarca).
- Termobloques de aluminio (KSystem®, Dinamarca).
- Aguja de punción 329350 Kitazato®.
- Dos incubadores Heraeus® con aporte de CO₂: Uno como soporte de trabajo durante la punción, y el otro destinado a la paciente.
- Placas de Petri de 10 cm (351029 Falcon®).
- Placas de Petri de 6 cm (351016 Falcon®).
- Tubos de fondo redondo (Benton, Dickinson and Company Reino Unido).
- Pipetas de Pasteur de vidrio desechables estériles (23 cm; Brand, Alemania).
- Bote contenedor recogida de orina estéril 150ml.
- Jeringas de insulina (Benton, Dickinson and Company Reino Unido).
- Agujas de 25G x1-1/2 (Benton, Dickinson and Company Reino Unido).
- Tetinas de silicona.

Los medios de cultivo empleados fueron:

- Medio de lavado de ovocitos tamponado: COOK® K-SIFB-100.
- Medio de cultivo de ovocitos: COOK® K-SIFM-100.
- Aceite mineral: LIFEGLOBAL® LGOL-500.
- Medio de lavado del sistema: COOK® K-SIFB-100.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los complejos cúmulo-ovocito (CCO), una vez liberados del folículo, son una estructura celular muy sensible. Será por lo tanto necesario un mantenimiento adecuado de las condiciones de temperatura, pH, e iluminación que tendrán que prolongarse hasta que los embriones sean de nuevo transferidos al útero.

Los CCO obtenidos tras la punción, pueden venir acompañados de restos de sangre debido a la rotura de pequeños vasos sanguíneos que irrigan a los folículos en crecimiento. Ambas sustancias, líquido folicular y sangre, han de ser eliminadas mediante lavados con medio previamente al cultivo de los ovocitos para su fecundación, debido a la presencia en el líquido folicular de sustancias inhibitorias de la maduración ovocitaria, así como por el efecto negativo que la sangre tiene sobre la futura división del embrión que se genera a partir de esos ovocitos.

Los ovocitos fueron incubados en medios de cultivo bajo unas condiciones especiales de concentración de CO₂ del 5% y 37 grados centígrados de temperatura.

Teniendo en cuenta que durante la estimulación ovárica se van a generar folículos de diferentes tamaños, no todos los ovocitos que se obtengan mediante esta intervención serán maduros, es decir, no todos los ovocitos que se recuperan serán adecuados para ser fecundados tras su inseminación.

6 MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA.

La técnica de la ICSI fue desarrollada por Palermo y su equipo en Bélgica, y con ella se revolucionó el tratamiento del factor masculino severo ya que requiere un solo espermatozoide vivo por ovocito. Los espermatozoides pueden obtenerse por eyaculación, aspiración del epidídimo, punción o biopsia testicular.

En el programa de DGP del IVI Valencia, y para evitar interferencias en el proceso diagnóstico debidas a los espermatozoides que quedan adheridos a

la zona pelúcida tras la FIV convencional, la técnica de fecundación es siempre la ICSI.

6.1 Indicaciones de la ICSI.

Entre las indicaciones de la ICSI pueden enumerarse las siguientes:

1. Factor masculino severo.
2. Azoospermia.
3. Infertilidad de causa inmunitaria.
4. Sémenes valiosos (cáncer, etc.).
5. Biopsia de testículo, aspiración de epidídimo.
6. Fallo de fecundación con FIV convencional.
7. Fallo de gestación con inseminación artificial.
8. Diagnóstico genético preimplantacional.
9. Maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros.
10. Mala calidad ovocitaria.
11. Inseminación de ovocitos desvitrificados.

6.2 Aspectos prácticos de la ICSI.

Al igual que las técnicas de micromanipulación anteriores, para la ICSI es necesario procesar los ovocitos de una forma determinada. El proceso de decumulación implica desprender al ovocito de las células del cúmulo que lo rodean, lo cual es útil por varias razones.

Por un lado, la cubierta de células que forman el CCO, impiden conocer el grado de maduración del ovocito, lo cual es necesario puesto que solo se inyectan aquellos que se encuentran en estadio de metafase II.

MATERIAL Y MÉTODOS

La manipulación es más sencilla, ya que sin estas células se puede orientar el ovocito y el corpúsculo polar de manera que evitemos dañar el huso meiótico. Además, es más fácil sujetarlo, puesto que las células del CCO son pegajosas y nos dificultan el manejo.

Una vez decumulados, es más fácil la observación de las características morfológicas de los mismos y así poder establecer un diagnóstico en cuanto a calidad ovocitaria se refiere.

Para la decumulación, sometimos a los ovocitos a una concentración de hialuronidasa (COOK® K-SIHY-1-5) de 80 UI/ml, durante menos de un minuto para evitar una posible activación del ovocito.

Los ovocitos fueron decumulados mediante el pase a través de capilares (COOK® K-FPIP-1140; COOK® K-FPIP-1170) de calibres progresivamente menores, hasta un diámetro aproximado de 140 μ m. Una vez decumulados, se clasificaron según su estadio de maduración. Los ovocitos maduros se lavaron en microgotas de 100 μ l de medio (COOK® K-SICM-100) y se guardaron en microgotas de 50 μ l del mismo, todas ellas dentro de la misma placa (150270Nunc®) cubiertas con aceite mineral (LIFEGLOBAL® LGOL-500), dentro del incubador Heraeus® hasta el momento de la ICSI.

Tras decumular los ovocitos, y preparar los espermatozoides, procedimos a realizar la preparación de la placa de ICSI (150270Nunc®) y la colocación de las pipetas de sujeción (*holding*) (Cook K-HPIP-1035) y de microinyección (ICSI) (CookK-MPIP-3335) en un microscopio invertido (Olympus®). A continuación se colocaron los ovocitos en la placa de microinyección y se procedió inmediatamente a la ICSI.

En la placa se dispusieron tres gotas de polivinilpirrolidona (PVP) (Life Global® Ref L-PVP-502) de unos 5 μ l, en el centro de una placa, y alrededor de éstas, 6 gotas de medio de cultivo tamponado de Hepes (COOK® K-SIGB-100), generalmente una gota por ovocito. En la parte superior se colocaron 3 gotas del mismo medio tamponado para lavar los ovocitos antes de pasarlos a su gota de microinyección correspondiente. A la izquierda del PVP se coloca 1 gota de medio tamponado con espermatozoides, en caso de que la muestra de

semen sea muy patológica. Todo ello cubierto con aceite mineral (LIFEGLOBAL® LGOL-500).

El PVP se emplea por su alta viscosidad y su incompresibilidad, para, por un lado, impedir moverse rápidamente a los espermatozoides y posibilitar su manipulación, y por otro, facilitar el control del espermatozoide dentro de la pipeta, ya que la presión ejercida por el microinyector (Eppendorf®) se transmite inmediatamente a través del medio PVP aspirado en la pipeta de inyección.

Durante la realización de la técnica, será necesaria la selección e inmovilización de los espermatozoides, golpeando la cola con ayuda de la pipeta de ICSI. Colocamos la pipeta sobre el tercio proximal a la zona media del espermatozoide y con un movimiento en sentido perpendicular al eje angulamos el flagelo. Una vez inmovilizado, se aspira con la pipeta de ICSI y se coloca el ovocito correctamente sujetándolo con la pipeta de *holding*. Después, deberemos presionar suave y gradualmente con la pipeta de inyección sobre la zona pelúcida, que deberá ser traspasada, momento en el cual seguiremos presionando la membrana del ovocito, procurando que se perfile perfectamente un cono alrededor de la pipeta y enfocándola de arriba abajo hasta conseguirlo.

El tipo de ruptura de la membrana plasmática del ovocito depende de las características de éste y condiciona su desarrollo posterior.

Se contemplan 4 tipos de ruptura de la membrana: 2 por presión (SS y A1) y 2 por aspiración (A2 y A3)

1. SS: Sin hacer presión ni formar cono sobre la membrana, ésta se rompe y se desliza a los lados de la pipeta de inyección. Este tipo de ruptura suele darse en ovocitos de mala calidad, que tienden a degenerar.
2. A1: Por presión, una vez perfilado el cono seguimos presionando hasta que la membrana se rompa y se deslice por los bordes de la pipeta. Entonces se aspira un poco de citoplasma, para

asegurarnos de que hemos roto la membrana, e inyectamos el espermatozoide.

Si no se consigue romper la membrana por presión, se intenta por aspiración. Una vez dentro del ovocito, y si no se ha producido ruptura de la membrana, seguimos presionando estando dentro del ovocito y aspiramos suavemente hasta que se produce un salto en el interior de la pipeta. Esto quiere decir que la membrana está rota. Según la cantidad aspirada hay dos tipos de ruptura:

1. A2: La ruptura se consigue antes de que el citoplasma aspirado dentro de la pipeta llegue a la altura de la zona pelúcida.
2. A3: La ruptura se consigue después de que el citoplasma aspirado llegue a la altura de la zona pelúcida.

Hay otro tipo de técnica alternativa a A2 y A3 que es el *stirring* en la cual, si no se ha conseguido romper la membrana plasmática por presión después de haberse introducido profundamente en el ovocito, se saca la pipeta y se vuelve a presionar, unas micras por debajo del primer sitio, hasta que se consigue romper la membrana.

Una vez conseguida la ruptura de la membrana completamos la ICSI. Para ello aspiramos citoplasma y nos cercioramos de que la membrana plasmática está rota y lo ponemos en contacto con el espermatozoide. Después, introducimos suavemente el espermatozoide procurando introducir la mínima cantidad de PVP en el interior del ovocito (Figura 14). Se finaliza anotando el lugar en el que se ha depositado el espermatozoide, tomando como referencia la posición del corpúsculo polar situándolo a las 12 o a las 6 horarias y dividiendo el ovocito en seis cuadrantes.

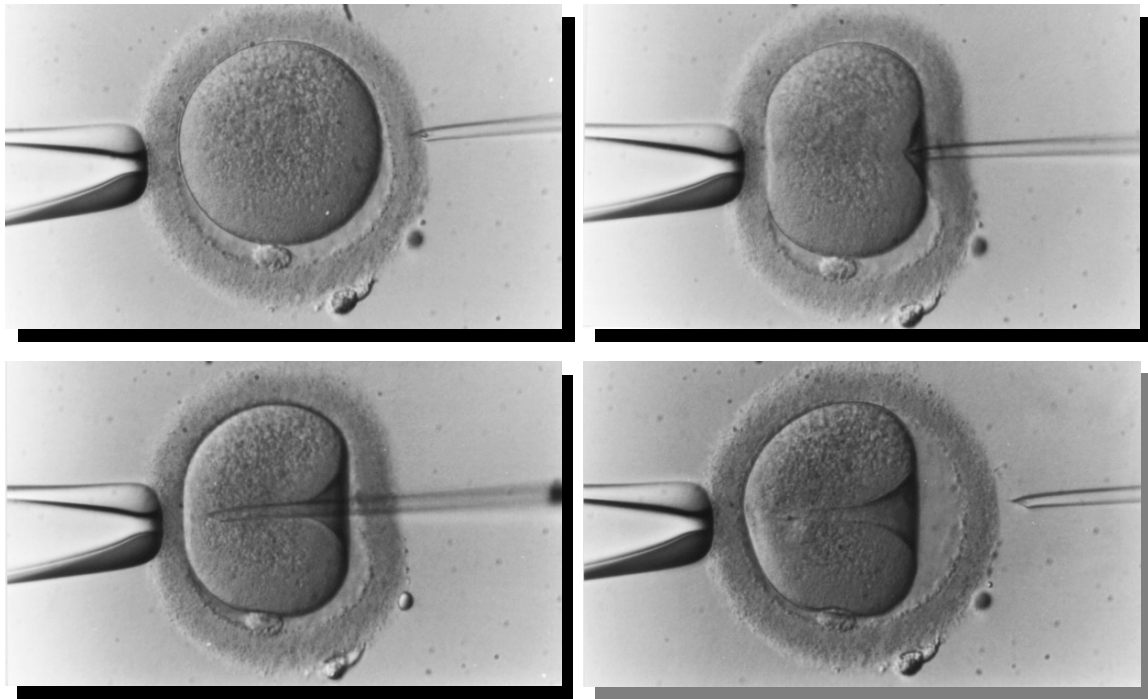


Figura 14: Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides¹².

6.3 ICSI con semen muy patológico.

En muchas ocasiones, y debido a la baja calidad de las muestras de semen, se hace necesario utilizar algunos tests de vitalidad que permitan detectar espermatozoides vivos para ser utilizados en la ICSI. En estos casos el uso de la pentoxifilina y el test hipoosmótico resultan de bastante utilidad.

La pentoxifilina proporciona un aumento del adenosín trifosfato (ATP) disponible para los espermatozoides, de manera que los espermatozoides vivos pero inmóviles comienzan a moverse. Se añade aproximadamente 1 µl de la solución de 300 mg/ml (Hemovás®, Ferrer) a la gota de medio tamponado con espermatozoides. Una vez capturados los espermatozoides móviles, se lavan en una gota de PVP para eliminar la pentoxifilina, que podría perjudicar al ovocito.

7 BIOPSIA EMBRIONARIA.

¹² Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana. (IVI)

7.1 Definición.

La biopsia embrionaria es una técnica invasiva que permite la obtención de 1 o 2 células de un embrión en división. El momento idóneo para realizar la biopsia es cuando los embriones tienen entre 6 y 8 células, ya que se ha comprobado que en este estadio, la extracción no afecta negativamente a su posterior desarrollo hasta blastocisto. Las células extraídas son procesadas para el estudio cromosómico y los embriones se mantienen en cultivo hasta que se obtienen los resultados, momento en el cual se realiza la transferencia. Actualmente, los protocolos de biopsia en día 3 de desarrollo aconsejan la extracción de una sola célula para no perjudicar el desarrollo embrionario posterior.

7.2 Protocolo de biopsia en D3.

La biopsia embrionaria (Figura 15) se realiza bajo microscopio invertido (Olympus YX71®), utilizando para la perforación de la zona pelúcida pulsos de láser (Octax Narishige®, Olympus). La biopsia con láser en día tres de desarrollo, fue el protocolo de elección en la presente tesis. El medio de cultivo de biopsia utilizado fue el GPGD® Vitrolife y las placas de petri (150270 Nunc®) de 6 centímetros. Todo ello cubierto con aceite mineral (LIFEGLOBAL® LGOL-500).

La biopsia con láser se basa en la producción de un orificio en la zona pelúcida mediante fototermólisis de su matriz proteica. El láser permite controlar la amplitud del orificio con gran precisión sin necesidad de micromanipulación adicional. En este caso, sólo son necesarias dos micropipetas adaptadas al micromanipulador, la de sujeción del embrión (Cook K-MPIP-1035), y la de aspiración de las células (MBB-BP-SM-30, Humagen). Una vez enfocado el embrión, seleccionamos una célula con un núcleo visible y regulamos el láser para un tiempo de exposición de 1,8 ms. Se realizan de 9-10 pulsos de láser de manera que se obtenga un orificio de unas 30µm, por el que se extraen las células para el diagnóstico.

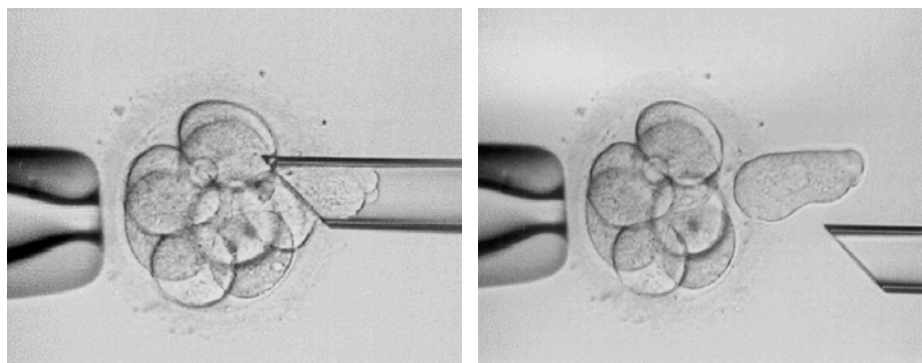


Figura 15: Biopsia embrionaria¹³.

7.3 Fijación de células.

Después de la biopsia, la célula se retira de la placa y se coloca en un pocillo con 0,5ml de medio de cultivo COOK® K-SIGB-100 al que se ha añadido un 5% de albúmina (HSA® Vitrolife). Seguidamente se aspira de nuevo la célula y se deposita sobre un portaobjetos previamente desengrasado. Se retira cuidadosamente el exceso de medio depositado y se valora la extensión de la célula sobre el portaobjetos.

Se coloca el portaobjetos en el microscopio de fases (Olympus®) y se deja caer, verticalmente sobre la célula, una primera gota de la solución de fijación metanol (1.06009.1000 Merck®): acético glacial (1.00063.1000 Merck®), en proporción 3:1, utilizando el método de Tarkowski (95). Se continúa añadiendo fijador hasta que se observa la desaparición de todo el citoplasma y el núcleo queda extendido.

8 ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH).

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente se ha utilizado ampliamente en el campo de la citogenética molecular y se puede aplicar tanto en metafases como en núcleos interfásicos. Utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos

¹³ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

MATERIAL Y MÉTODOS

de un cromosoma. De este modo, permite enumerar el número de copias de un determinado cromosoma presentes en el núcleo de una célula.

Se comenzó utilizando sondas marcadas indirectamente con biotina o digoxigenina y como reactivos secundarios, anticuerpos avidina y antidigoxigenina, conjugados con fluoresceína o rodamina. En la actualidad se han comercializado sondas marcadas directamente con uno o más fluorocromos para todos los cromosomas. Las sondas con marcaje directo permiten visualizar las señales de forma inmediata después de los lavados post-hibridación y reducen el tiempo necesario para el análisis.

Las sondas utilizadas en núcleos interfásicos pueden ir dirigidas a diferentes tipos de secuencias de ADN:

1. Secuencias centroméricas: Secuencias de ADN satélite (150-300pb), altamente repetitivas y específicas, localizadas habitualmente en el centrómero de cada cromosoma.
2. Secuencias específicas de *locus*: Secuencias de ADN de copia única (200-400kb) o con un número reducido de copias, específicas de genes o *loci* génicos.
3. Secuencias subteloméricas: Secuencias de ADN de copia única específicas y localizadas en los extremos terminales de cada cromosoma (60-175kb).

La técnica se basa en las propiedades del ADN por las que la doble cadena se separa cuando se eleva la temperatura por rotura de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas complementarias. La temperatura de desnaturalización depende de la longitud de la cadena, de la secuencia y de la composición química del medio en el que se encuentra. La presencia de cationes monovalentes de sodio (Na^+) estabiliza los dúplex de ADN mientras que desnaturalizantes químicos, como la formamida, los desestabilizan, también por rotura química de los puentes de hidrógeno. Básicamente la técnica consiste en:

1. La desnaturalización de la doble cadena de ADN de la muestra biológica y de las sondas fluorescentes (MultiVyson PB panel, Vysis Inc. Downers Grove, IL, U.S.A.), utilizadas para obtener ADN de cadena sencilla.
2. La hibridación bajo condiciones controladas de humedad y temperatura de la sonda de cadena sencilla con su secuencia complementaria del núcleo evaluado para formar heterodúplex.
3. La detección de las señales con microscopio de fluorescencia (Olympus PROVIS AX-70) tras realizar una serie de lavados para eliminar el exceso de sonda unido inespecíficamente al núcleo evaluado.

Las extensiones con los núcleos se pueden desnaturalizar por separado o bien de forma conjunta (co-desnaturalización). En el primer caso, para desnaturalizar las muestras, se colocan los portaobjetos en una cubeta coplin con una solución de formamida al 70% (Roche®) atemperada a $73^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en un baño termostatzado. La mezcla de las sondas, que también contiene formamida, se coloca en un tubo eppendorf y se desnaturaliza por separado también en el baño a $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$. En la co-desnaturalización, la mezcla de sondas se coloca directamente sobre el área de hibridación del portaobjetos y se desnaturaliza de forma conjunta en una placa calefactora. El tiempo y la temperatura de hibridación van a depender del tipo de sonda utilizada.

El protocolo y las sondas utilizadas van a variar en función de la indicación del DGP. La hibridación simultánea con sondas centroméricas y específicas de *locus* para varios cromosomas, permite descartar muchas de las aneuploidías humanas más importantes.

Para nuestro estudio, se realizó una FISH secuencial en la que tras una primera ronda de hibridación, para unos determinados cromosomas, se interpretaron y se registraron las señales (Figura 16). A continuación, se procedió a una nueva hibridación utilizando sondas para otros cromosomas diferentes. Se analizaron cómo mínimo los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22,

MATERIAL Y MÉTODOS

X e Y, que son los que están relacionados con los abortos espontáneos y con las cromosomopatías más frecuentes.

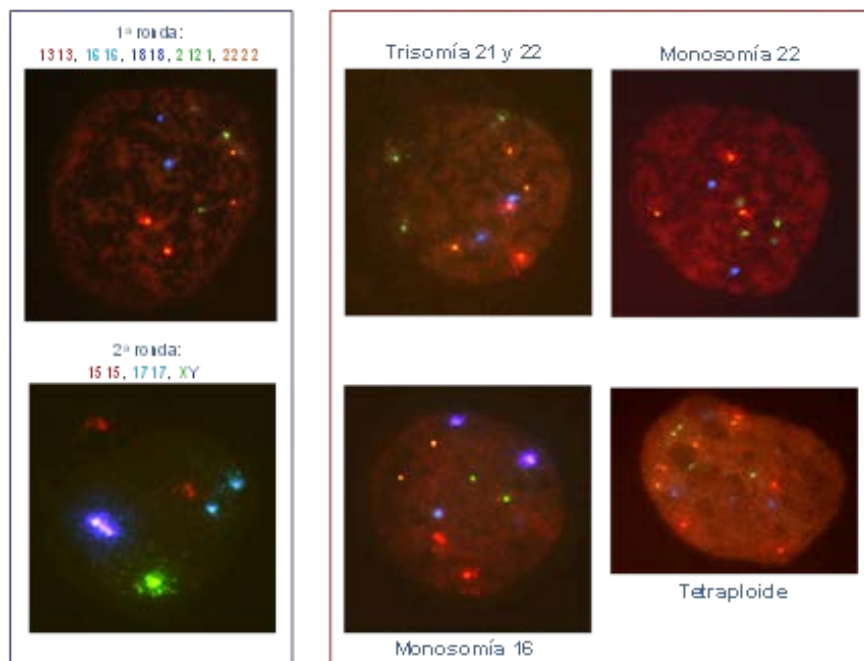


Figura 16: FISH en núcleos (embrión normal y anomalías)¹⁴.

9 Transferencia embrionaria.

La transferencia embrionaria constituye el último paso en el proceso de la fecundación *in vitro*.

Actualmente, la transferencia intrauterina de los embriones por vía vaginal (Figura 17) es la técnica más empleada, siendo ya muy raros los casos en los que se realiza por otra vía, como la transferencia tubárica de embriones.

¹⁴ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

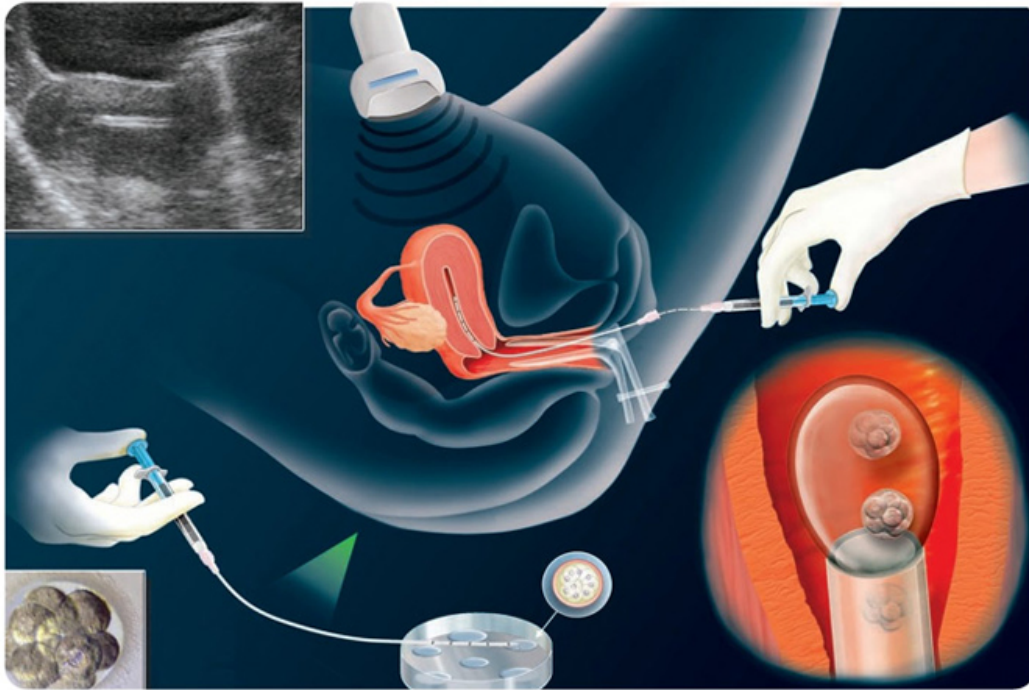


Figura17: Esquema de transferencia embrionaria vía vaginal¹⁵.

Desde el punto de vista de nuestro laboratorio, existen dos aspectos importantes como son el día en el que se realizará la transferencia, y el número de embriones a transferir. En el protocolo del IVI Valencia, los embriones se transfieren en el tercer día después de la recuperación de los ovocitos, aunque podemos acortar o alargar el cultivo embrionario, y realizar la transferencia en el día 2, día 5 o día 6 después de la inseminación, si las indicaciones clínicas de la paciente así lo exigen.

En cuanto al número de embriones a transferir, éste dependerá principalmente de la edad de la paciente, su historia clínica y la calidad de la cohorte embrionaria, pero siempre debe tender a ser el menor posible para intentar conseguir un embarazo único y evitar, en la medida de lo posible, las gestaciones múltiples.

En la presente tesis, además, el número de embriones a transferir estuvo condicionado por la disponibilidad de embriones euploides.

¹⁵ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

Actualmente, la ley de reproducción asistida no permite transferir más de tres embriones en una misma transferencia. Esto es importante porque el número de embriones transferidos, aunque repercute directamente en la tasa de gestación, es el principal responsable de los embarazos múltiples.

La transferencia es un procedimiento muy sencillo en lo que a aspectos puramente biológicos se refiere y donde lo más importante será mantener controladas, en todo momento, las condiciones de temperatura y pH.

Para una buena transferencia, es de vital importancia que la paciente disponga de las instrucciones necesarias relacionadas con este procedimiento. Según nuestro protocolo, las pacientes acudieron a la transferencia con la vejiga llena, para una mejor visualización del útero por ecografía abdominal, y nos aseguramos de que estaban administrándose, de forma correcta, la medicación necesaria para la obtención de un grosor y una calidad endometrial adecuados para la recepción de los embriones. Normalmente, la administración de la progesterona es por vía vaginal y en algunos casos se puede complementar con inyecciones intramusculares de la misma.

Al igual que el resto de los procesos implicados en la fecundación *in vitro*, las transferencias embrionarias se realizaron bajo las condiciones de asepsia que rigen el trabajo en el laboratorio.

El quirófano donde se realice la transferencia debe estar lo más cerca posible del laboratorio de FIV, haciendo mínimo el tiempo requerido para que el embrión pase del medio de cultivo hasta su introducción en la cavidad uterina, manteniendo así las condiciones óptimas para una buena transferencia.

La carga de embriones se realizó en una cánula de transferencia adecuada, una vez que el ginecólogo/a tenía a la paciente preparada. Los embriones se cargaron con la mínima cantidad de medio de cultivo posible (CCM® Vitrolife), alternando fases de aire y medio. Una vez depositados los embriones, bajo control ecográfico, dentro de la cavidad uterina a través del cuello del útero, se comprobó bajo la lupa estereoscópica (Olympus®), que los embriones no habían quedado retenidos en la cánula.

Algunos estudios, tras comparar distintos tipos de catéteres, han demostrado que los que ofrecen mayores tasas de gestación son los de tipo blando (96). La cánula blanda más usada por el equipo del IVI Valencia es la WALLACE® 1816 (Figura 18). En caso de que la prueba de transferencia presente alguna dificultad, existe la posibilidad de cambiar la cánula por otra rígida como, por ejemplo, la *Delphin* o la *Plus* (Gynetics Medical Products, Bélgica).

El uso de una cánula u otra durante la presente tesis, estuvo condicionado por la exploración clínica de la paciente y la prueba de transferencia previa a la carga de embriones.



Figura 18: Cánulas de transferencia embrionaria¹⁶.

10 Análisis estadístico.

Mediante las pruebas estadísticas que se describen a continuación realizaremos el desarrollo del modelo predictivo.

10.1 Regresión logística.

La regresión logística es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (una variable que puede adoptar un número limitado de categorías) en función de las variables independientes o predictivas. Es útil para modelar la probabilidad de un evento

¹⁶ Imágenes obtenidas del Manual práctico de Reproducción y Esterilidad humana.(IVI)

que ocurre en función de otros factores. El análisis de regresión logística se enmarca en el conjunto de Modelos Lineales Generalizados (GLM por sus siglas en inglés) que usa como función de enlace la función *logit*. Las probabilidades que describen el posible resultado de un único ensayo se modelan, como una función de variables explicativas, utilizando una función logística.

10.2 Curvas ROC.

Una curva ROC (acrónimo de *Receiver Operating Characteristic*, o Característica Operativa del Receptor) es una representación gráfica de la sensibilidad frente a (1 – especificidad) para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación. Otra interpretación de este gráfico es la representación de la razón o *ratio* de verdaderos positivos (VPR = Razón de Verdaderos Positivos) frente a la razón o *ratio* de falsos positivos (FPR = Razón de Falsos Positivos) también según se varía el umbral de discriminación (valor a partir del cual decidimos que un caso es un positivo). ROC también puede significar *Relative Operating Characteristic* (Característica Operativa Relativa) porque es una comparación de dos características operativas (VPR y FPR) según cambiamos el umbral para la decisión.

El análisis de la curva ROC, o simplemente análisis ROC, proporciona herramientas para seleccionar los modelos posiblemente óptimos y descartar modelos subóptimos independientemente de, y antes de especificar, el coste de la distribución de las dos clases sobre las que se decide. La curva ROC es también independiente de la distribución de las clases en la población (en diagnóstico, la prevalencia de una enfermedad en la población). El análisis ROC se relaciona de forma directa y natural con el análisis de coste/beneficio en toma de decisiones diagnósticas.

10.3 Odds Ratio.

Es una medida estadística utilizada en estudios epidemiológicos transversales, y de casos y controles, así como en los meta análisis. En

términos formales, se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro. En epidemiología, la comparación suele realizarse entre grupos humanos que presentan condiciones de vida similares, con la diferencia de que uno se encuentra expuesto a un factor de riesgo (m_i) mientras que el otro carece de esta característica (m_o). Por lo tanto, la razón de momios, o de posibilidades, es una medida de tamaño de efecto.

10.4 Intervalo de confianza.

En estadística, se define como un par o varios pares de números entre los cuales se estima que estará cierto valor desconocido con una determinada probabilidad de acierto. Formalmente, estos números determinan un intervalo, que se calcula a partir de datos de una muestra, y el valor desconocido es un parámetro poblacional. La probabilidad de éxito en la estimación se representa con $1 - \alpha$ y se denomina nivel de confianza. En estas circunstancias, α es el llamado error aleatorio o nivel de significación, esto es, una medida de las posibilidades de fallar en la estimación mediante tal intervalo.

El nivel de confianza y la amplitud del intervalo varían conjuntamente, de forma que un intervalo más amplio tendrá más probabilidad de acierto, mayor nivel de confianza, mientras que para un intervalo más pequeño, que ofrece una estimación más precisa, aumenta su probabilidad de error.

Para la construcción de un determinado intervalo de confianza es necesario conocer la distribución teórica que sigue el parámetro a estimar, θ . Es habitual que el parámetro presente una distribución normal. También pueden construirse intervalos de confianza con la desigualdad de Chebyshev.

En definitiva, un intervalo de confianza al $1 - \alpha$ por ciento, para la estimación de un parámetro poblacional θ que sigue una determinada distribución de probabilidad, es una expresión del tipo $[\theta_1, \theta_2]$ tal que $P[\theta_1 \leq \theta \leq \theta_2] = 1 - \alpha$, donde P es la función de distribución de probabilidad de θ .

RESULTADOS

IV RESULTADOS

1 DESCRIPTIVOS POBLACIONALES.

1.1 Descripción de la cohorte embrionaria del estudio.

Estadio D4, Bloqueado(0), cel (1) M (2) Blast(3)

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0	254	3.1	3.4	3.4
	1	2501	30.3	33.3	36.7
	2	4650	56.3	62.0	98.7
	3	97	1.2	1.3	100.0
	Total	7502	90.8	100.0	-
Perdidos	Sistema	760	9,2	-	-
Total		8262	100.0	-	-

Tabla 9: Descripción cohorte embrionaria día 4.

Referido al estadio embrionario en día 4, y con una n=8262 embriones, se observaron unos valores estadísticos por categorías como siguen:

Bloqueados: 3.4%

Células: 33.3%

Mórula: 62.0%

Blastocisto: 1.3%

Estadio D5, Bloqueado(0), M (1) Blast (2)

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0	1009	12.2	12.6	12.6
	1	2397	29.0	30.0	42.7
	2	4579	55.4	57.3	100.0
	Total	7985	96.6	100.0	-
Perdidos	Sistema	277	3.4	-	-
Total		8262	100.0	-	-

Tabla 10: Descripción cohorte embrionaria día 5.

Referido al estadio embrionario en día 5, y con una n=8262 embriones, se observaron unos valores estadísticos por categorías como siguen:

RESULTADOS

Bloqueados: 12.6%

Mórula: 30.0%

Blastocisto: 57.3%

Normal (1) Anormal (0)

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	0	5497	66.5	66.5	66.5
	1	2765	33.5	33.5	100.0
	Total	8262	100.0	100.0	-

Tabla 11: Descripción cohorte embrionaria normales/anormales.

En cuanto a la carga cromosómica del embrión una vez conocido el resultado del DGP, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Normal: 33.5%

Anormal: 66.5%

Tipo de embrión en D5 recodificado

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Bloqueado	1035	12.5	12.9	12.9
	Mórula	2397	29.0	29.9	42.8
	Blast Temprano	1501	18.2	18.7	61.6
	Blast Cavitado	783	9.5	9.8	71.4
	Blast Expandido	244	3.0	3.0	74.4
	Blast Hatching	1958	23.7	24.4	98.8
	Blast Hatched	93	1.1	1.2	100.0
	Total	8011	97.0	100.0	-
Perdidos	Sistema	251	3.0	-	-
Total		8262	100.0	-	-

Tabla12: Descripción morfología cohorte embrionaria día 5 por categorías.

Referido a la morfología embrionaria en día 5, y con una n=8262 embriones, se observaron unos valores estadísticos por categorías como siguen:

Bloqueado: 12.9%

Mórula: 29.9%

Blastocisto temprano: 18.7%

Blastocisto cavitado: 9.8%

Blastocisto expandido: 3.0%

Blastocisto hatching: 24.4%

Blastocisto hatched: 1.2%

Descriptivos de la cohorte embrionaria días 2 y 3

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Ovocitos::Nº cel divis 2	8253	1	9	3.75	.996
Ovocitos::frag divis 2	8254	0	60	8.17	6.115
Ovocitos::Nº cel divis 3	8250	1	12	7.58	1.440
Ovocitos::frag divis 3	8219	0	60	9.38	6.391
N válido (por lista)	8208	-	-	-	-

Tabla13: Descripción morfología embrionaria días 2 y 3 de desarrollo.

En cuanto a la morfología en día 2 y día 3 de desarrollo, en la tabla vienen reflejados los valores para la media y la desviación estándar de los parámetros estudiados.

1.2 Descriptivos de la población de estudio.

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Edad	1920	23	53	37.50	4.113
Dosis FSH	-	75	7650	2343.73	897.344
Dosis HMG	-	150	7650	1286.28	772.175
Dosis LH	-	2	4125	855.58	456.947
E2_DhCG	-	0	6392	1883.06	1096.199
P4_DhCG	-	.00	11.00	.7872	.56406
Nº ovocitos	-	1	41	11.34	6.807
MII	-	1	38	9.04	5.563
MII 2 pronúcleos	-	1	27	6.26	4.105
nº ET único	-	0	4	1.08	.896
Aborto %	-	2.00%	82.00%	43.500%	20.62516%
Normales	-	0	22	4.75	3.326
Tasa de Implantación	-	.00	200.0	33.906	37.52935
IMC	-	.60	41.88	23.6589	3.92424
Dosis Total	-	0	10150	3057.23	1347.379
N válido (por lista)	-	-	-	-	-

Tabla 14: características de la población de estudio.

RESULTADOS

En cuanto a la población de estudio, 1920 pacientes, en la tabla vienen reflejados los valores para la media y la desviación estándar de cada uno de los parámetros estudiados.

2 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS (marcadores o variables relacionados y/o predictivas).

En el presente estudio, se pretendió cuantificar el efecto que determinados patrones clínicos, observados o efectuados, condicionan en la normalidad cromosómica.

Clasificando las variables en categorías, en función de los momentos y origen de las mismas, mediante la regresión logística y el método forward de máxima verosimilitud, nos quedamos solo con aquellas variables que tienen un efecto relevante.

Primero cuantificamos su efecto mediante el Odds ratio (OR) y su intervalo de confianza (IC), y después utilizamos las variables importantes para crear un modelo predictivo que permita obtener una predicción en función de una serie de variables clínicas.

2.1 Morfología embrionaria.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Morfología	--	-	No relevante	-
Espermática				
Pentoxifilina	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	No relevante	-

Tabla 15: Resultados. Morfología espermática.

En un modelo de regresión logística, y analizando la relevancia de la morfología espermática y del uso de la pentoxifilina durante la ICSI en la normalidad cromosómica del embrión, se observó que ninguno de estos dos parámetros era relevante. En consecuencia, el hecho de que se inyectaran espermatozoides con morfología anormal o que fuera necesaria la utilización de pentoxifilina por la ausencia de movilidad, no aumentó el riesgo de generar un embrión aneuploide. La significancia del modelo fue calculada con el test

ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R².

-	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Patrón Pronuclear I	-	-	-	-
Patrón Pronuclear II	1.205	1.045-1.390	0.010	-
Patrón Pronuclear III	1.196	1.050-1.363	0.007	-
Patrón Pronuclear IV	0.981	0.865-1.111	0.758	-
Simetría Pronuclear	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	0.001	0.003

Tabla 16: Resultados. Patrón pronuclear.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de la morfología del cigoto, concretamente el patrón pronuclear definido por Scott con sus 4 tipos(12) y la simetría de los dos pronúcleos también definida en la sección de material y métodos. En referencia al patrón pronuclear y tomando como referencia el tipo I, las distribuciones nucleolares II y III se asociaron con una disminución de la probabilidad de euploidía, o en otras palabras , con un patrón pronuclear tipo II o III, aumentaron las probabilidades de obtener un embrión aneuploide. La simetría de los pronúcleos no fue un parámetro relevante. La significancia del modelo fue calculada con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R².

Incluyendo la variables de la morfología del cigoto, en un modelo predictivo de la euploidía embrionaria, se realizó un análisis de curvas ROC. Los resultados se detallan a continuación.

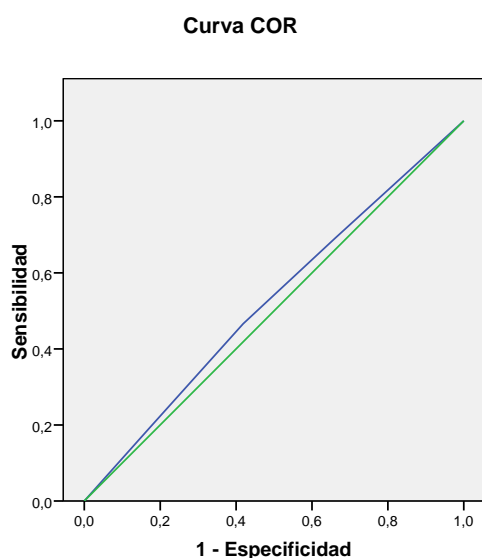


Figura 19: Resultados. Curva ROC con variables de morfología del cigoto.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.525	.007	.000	.512	.538

Tabla 17: Resultados. Área bajo la curva con variables de morfología del cigoto.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.525), observamos que el patrón pronuclear no tuvo valor predictivo por sí mismo sobre la normalidad cromosómica del embrión a pesar de ser estadísticamente significativo. Su valor fue cercano a 0.5, que definiría la ausencia de relación

Parametro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Número de células	0.953	0.908-0.999	0.047	-
% Fragmentación	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo I	-	-	-	-
Fragmentación Tipo II	1.060	0.953-1.179	0.282	-
Fragmentación Tipo III	0.908	0.794-1.038	0.158	-
Fragmentación Tipo IV	0.779	0.560-1.083	0.137	-
Simetría I	-	-	-	-
Simetría II	0.946	0.837-1.068	0.370	-
Simetría III	0.693	0.576-0.835	0.000	-

Multinucleación (1)	-	-	-	-
Multinucleación (2)	0.620	0.520-0.739	0.000	-
Multinucleación (3)	0.463	0.319-0.671	0.000	-
Multinucleación (4)	0.454	0.129-1.599	0.000	-
Modelo Final	-	-	0.001	0.015

Tabla 18: Resultados. Morfología del embrión en día 2 de desarrollo.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 2 de desarrollo, tomando en cuenta el número de células, así como el porcentaje y el tipo de fragmentación, la simetría embrionaria y la multinucleación.

Se observó que, el número de células que presentaba el embrión sí que era significativo, reflejando que a mayor número de células en día 2, menor probabilidad de que el embrión fuera euploide como se observó con la odds ratio menor de 1 siendo esta diferencia significativa ($p=0.047$).

En cuanto al porcentaje de fragmentación, no condicionó la euploidia y no está presente en el modelo. Respecto al tipo, y tomando como referencia la fragmentación tipo I, aunque está presente en el modelo no condicionó la euploidia ya que ninguno de los tipos fue estadísticamente significativo.

Finalmente, la multinucleación de las células nos confirma algo que de manera intuitiva ya suponíamos. Tomando como referencia la ausencia de multinucleación, observamos cómo las posibilidades de tener un embrión euploide disminuyeron según aumentó la multinucleación del mismo, siendo los valores progresivos, en todos los tipos, estadísticamente significativos a medida que aumentó la multinucleación.

La significancia del modelo fue calculada con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable, sobre la normalidad embrionaria, se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R².

Incluyendo las variables de la morfología del embrión, en día 2, en un modelo predictivo de la euploidía embrionaria, se realizó un análisis de curvas ROC. Los resultados se detallan a continuación.

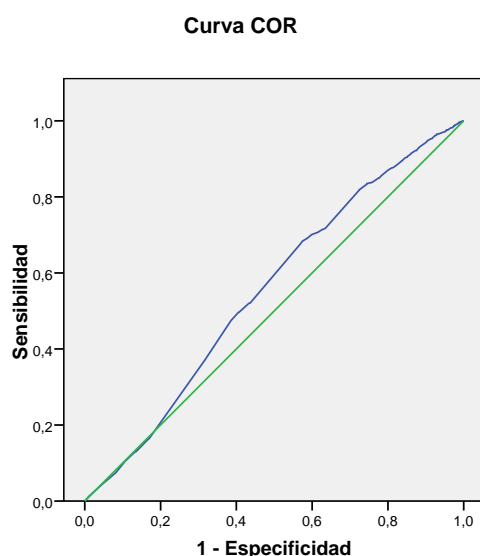


Figura 20: Resultados. Curva ROC morfología del embrión en día 2.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.553	.007	.000	.541	.566

Tabla 19: Resultados. Área bajo la curva de morfología del embrión en día 2.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.553), observamos que la morfología embrionaria del embrión, en día 2, no tenía valor predictivo por sí mismo sobre la normalidad cromosómica del embrión, a pesar de ser estadísticamente significativo, su valor fue cercano a 0.5, que definiría la ausencia de relación.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Número de células	0.962	0.931-0.993	0.018	-
% Fragmentación	0.989	0.981-0.996	0.003	-
Fragmentación Tipo I	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo II	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo III	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo IV	-	-	No relevante	-
Simetría I	-	-		-

Simetría II	0.824	0.710-0.957	0.011	-
Simetría III	0.598	0.496-0.720	0.000	-
Multinucleación	0.750	0.677-0.830	0.000	-
Modelo Final	-	-	0.000	0.018

Tabla 20: Resultados. Morfología del embrión en día 3 de desarrollo.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 3 de desarrollo, tomando en cuenta el número de células, así como el porcentaje y el tipo de fragmentación, la simetría embrionaria y la multinucleación.

Se observó que el número de células que presentaba el embrión, en día 3, reflejaba que a mayor número de células, menor probabilidad de que el embrión fuera euploide como se indica con la OR menor de 1, siendo esta diferencia significativa ($p=0.018$).

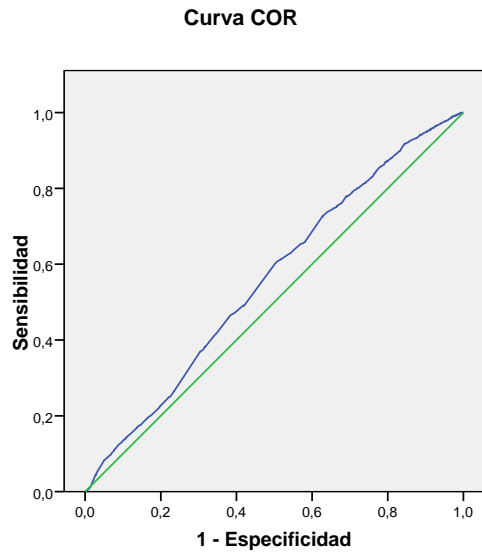
En cuanto al porcentaje de fragmentación, sí que condicionó la euploidia como así nos lo indicó una OR por debajo de uno y además, fue estadísticamente significativo ($p=0.003$). A mayor porcentaje de fragmentación, menor probabilidad de euploidía. Respecto al tipo, y tomando como referencia la fragmentación tipo I, la distribución de los fragmentos no condicionó la euploidia ya que ninguno de los tipos de distribución fue estadísticamente significativo respecto a la distribución I.

Respecto a la multinucleación de las células, pudimos comprobar cómo las posibilidades de tener un embrión euploide disminuyeron según aumentó la multinucleación del mismo, siendo los valores progresivos a medida que aumentó la multinucleación y estadísticamente significativos. En este caso no obtuvimos datos del tipo de multinucleación, solo del número de células multinucleadas.

La significancia del modelo, que hace referencia a la morfología en día 3 y su capacidad de predecir la euploidia embrionaria, se calculó con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R2.

RESULTADOS

Incluyendo las variables de la morfología del embrión, en día 3, en un modelo predictivo de la euploidía embrionaria, se realizó un análisis de curvas ROC. Los resultados se detallan a continuación.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 21: Resultados. Curva ROC morfología del embrión en día 3.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.559	.007	.000	.546	.572

Tabla 21: Resultados. Área bajo la curva de morfología del embrión en día 3.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.559), vemos que la morfología embrionaria del embrión, en día 3, no tuvo valor predictivo por sí mismo sobre la normalidad cromosómica del embrión, a pesar de ser estadísticamente significativo, su valor fue cercano a 0.5, lo que definiría la ausencia de relación.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Bloqueado	-	-	-	-
Células	2.857	1.943-4.202	0.000	-
Mórula	4.207	2.876-6.155	0.000	-
Blastocisto	8.665	5.006-14.997	0.000	-
Modelo final	-	-	0.000	0.024

Tabla 22: Resultados. Morfología del embrión en día 4 de desarrollo.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 4 de desarrollo, tomando en cuenta el estadio, es decir, células, mórula o blastocisto.

Tomando como referencia los embriones bloqueados, observamos cómo la posibilidad de euploidía aumentó en función del estadio embrionario. Así pues, aquellos embriones que en día 4 de desarrollo ya habían alcanzado el estadio de blastocisto, tuvieron hasta cuatro veces más opciones de ser euploides que aquellos que todavía se encontraban en células, y dos veces más que los que ya eran mórulas.

Así nos lo indicaban las odds ratio de la tabla , observándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.024$).

La significancia del modelo que hace referencia a la morfología en día 4 y su capacidad de predecir la euploidia embrionaria, se calculó con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R2.

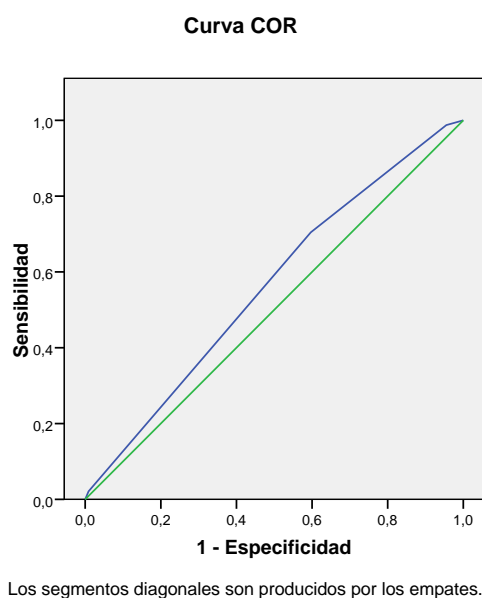


Figura 22: Resultados. Curva ROC de morfología del embrión en día 4.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.561	.007	.000	.548	.575

Tabla 23: Resultados. Área bajo la curva de morfología del embrión en día 4.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.561), vemos que la morfología embrionaria del embrión, en día 4, no tuvo valor predictivo por sí mismo sobre la normalidad cromosómica del embrión, a pesar de ser estadísticamente significativo, su valor fue cercano a 0.5, que definiría la ausencia de relación.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Bloqueado	-	-	-	-
Mórula	3.287	2.630-4.107	0.000	-
Blastocisto	6.689	5.411-8.269	0.000	-
Modelo final	-	-	0.000	0.088

Tabla 24: Resultados. Morfología del embrión en día 5.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 5 de desarrollo, tomando en cuenta el estadio, es decir, mórula o blastocisto.

Tomando como referencia los embriones bloqueados, observamos cómo la posibilidad de euploidía aumentó en función del estadio embrionario. Así pues, aquellos embriones que en día 5 de desarrollo ya habían alcanzado el estadio de blastocisto, tuvieron hasta tres veces más opciones de ser euploides que aquellos que todavía se encontraban en estadio de mórula.

Así nos lo indicaban las OR de la tabla, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.088$).

La significancia del modelo que hace referencia a la morfología, en día 5, y su capacidad de predecir la euploidia embrionaria, se calculó con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R2.

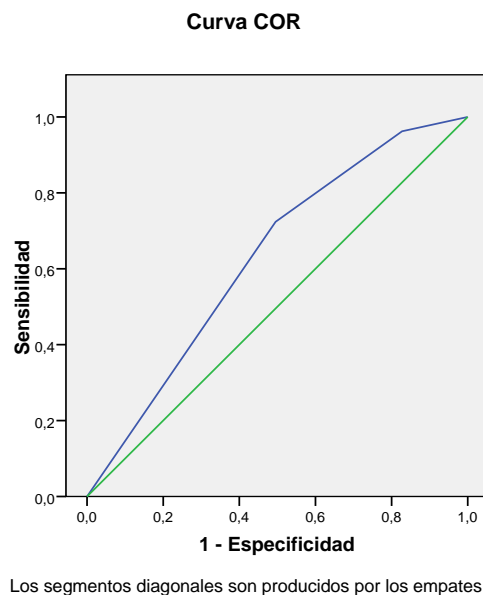


Figura 23: Resultados. Curva ROC de morfología del embrión en día 5.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada

RESULTADOS

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.629	.006	.000	.616	.641

Tabla 25: Resultados. Área bajo la curva de morfología del embrión en día 5.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.629), vemos que la morfología embrionaria del embrión, en día 5, no tuvo valor predictivo por sí mismo sobre la normalidad cromosómica del embrión, a pesar de ser estadísticamente significativo, su valor fue cercano a 0.6, que definiría la ausencia de relación.

2.2 Variables clínicas.

2.2.1 Etiologías (modelo edad etiologías).

Las etiologías femeninas y masculinas diagnosticadas por el facultativo/a, previamente a realizar el diagnóstico preimplantacional, no fueron relevantes en este modelo en cuanto a su relación con la normalidad cromosómica del embrión.

2.2.2 Estimulación (modelo edad estimulación).

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Edad materna	0.903	0.887-0.920	0.000	-
Agonista	-	-	-	-
Antagonista	1.208	1.019-1.432	0.029	-
FSH	-	-	No relevante	-
HMG	-	-	No relevante	-
FSH+hMG	-	-	No relevante	-
FSH+LH	-	-	No relevante	-
Días de estimulación	-	-	No relevante	-
Total dosis gonadotropinas	-	-	No relevante	-
Niveles Estradiol (antes de hCG)	-	-	No relevante	-
Niveles progesterona (antes de hCG)	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	0.028	0.047

Tabla 26: Resultados. Modelo edad estimulación.

En un modelo de regresión logística, se contemplaron las distintas variables en una estimulación tales como el tipo de estimulación y el fármaco utilizado en la misma, los días de estimulación, la dosis total de gonadotropinas, y los niveles de estradiol y progesterona previos a la administración de la gonadotropina coriónica humana (HCG).

Sí que se observó que, en los protocolos de estimulación en los que se desensibilizaba la hipófisis con antagonista (protocolo corto), aumentaron las posibilidades de generar un embrión euploide.

Respecto a la edad, igualmente y por lógica, a mayor edad menor probabilidad de obtener un embrión euploide, siendo la OR referente a una /año.

Se observó que ninguna de ellas por separado, ni en su conjunto, ejercieron influencia sobre la normalidad cromosómica del embrión, no existiendo significación estadística.

La significancia del modelo se calculó por el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad del embrión se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R^2 .

2.3 Modelo predictivo final.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R^2
Edad Paciente	0.922	0.911-0.934	0.007	-
Multinucleación(1) 48 h	-	-	-	-
Multinucleación (2)	0.736	0.608-0.892	0.002	-
Multinucleación (3)	0.644	0.426-0.974	0.037	-
Multinucleación (4)	0.625	0.167-2.330	0.483	-
Simetría I (72h)	-	-	-	-
Simetría II	0.746	0.630-0.884	0.001	-
Simetría III	0.568	0.462-0.698	0.001	-
Bloqueado (Día 4)	-	-	-	-
Células	0.938	0.438-1.844	No significativo	-
Mórula	0.774	0.393-1.523	No significativo	-
Blastocisto	1.045	0.472-2.316	-	-
Mórula (Día 5)	-	-	-	-
Blastocisto Temprano	4.033	3.044-5.341	0.000	-
Blastocisto Cavitado	7.084	5.318-9.436	0.000	-

RESULTADOS

Blastocisto Expandido	8.860	6.392-11.787	0.000	-
Blastocisto <i>Hatching</i>	11.107	7.634-16.122	0.000	-
Blastocisto <i>Hatched</i>	10.166	7.634-13.538	0.000	-
Modelo Final	-		0.000	0.142

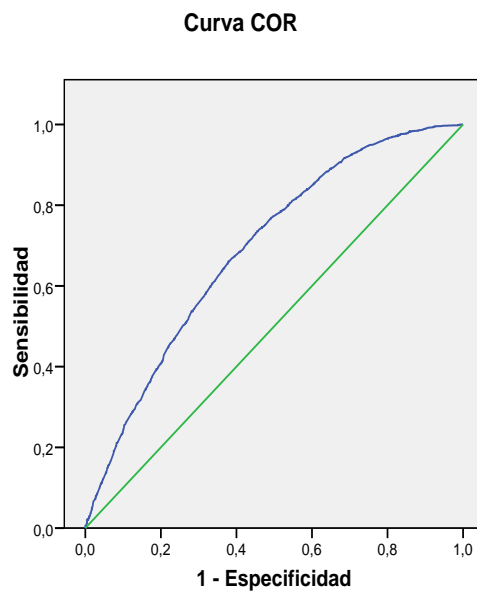
Tabla 27: Resultados. Modelo predictivo final morfología.

En un modelo de regresión logística final se trataron de contemplar todas las variables significativas descritas en todos los modelos parciales anteriores para unirlos en un modelo final que las englobara a todas y registrara la interacción entre ellas. Se tuvieron en cuenta una serie de parámetros tales como la morfología embrionaria (multinucleación, fragmentación, simetría, morfología en día 4 y día 5), la edad de la paciente, y su influencia a la hora de determinar la euploidía del embrión.

De la tabla se dedujo el funcionamiento de este modelo global en el que a mayor simetría y menor multinucleación, mayor probabilidad de euploidía. También la edad de la paciente pareció influir, siendo estadísticamente significativa.

Además, la morfología embrionaria en día 4 y día 5 nos sugirió, que a mayor evolución del embrión, mayor posibilidad de ser euploide, con diferencias muy amplias en cuanto a los resultados de las odds ratio. Al combinar la morfología de estos dos días pudimos comprobar que ambas se relacionaron, predominando el efecto de día 5 sobre el de día 4 anulando su condicionamiento. Aun así permanece en el modelo.

La significancia del modelo se calculó por el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad del embrión se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R^2 .



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 24: Resultados. Curva ROC modelo predictivo final morfología.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada modelo Final

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.691	.006	.000	.679	.703

Tabla 28: Resultados. Área bajo la curva modelo predictivo final morfología.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.691), vemos que en este caso, y utilizando un modelo que combinaba las variables más relevantes observadas en los modelos parciales, conseguimos un valor predictivo muy superior a los modelos parciales, en este caso cercano a 0.7. Aunque es un valor superior, no llega a 0.8 y por lo tanto no podemos considerarlo de gran valor predictivo pero sí aceptable.

RESULTADOS

2.4 Modelo predictivo de anomalía cromosómica en base a parámetros embrionarios y edad.

Por orden, la variable más relevante en el modelo fue la edad seguida de la multinucleación en día 2, simetría en día 3, estadio en día 4 y estadio en día 5. El resto de variables que están en la base de datos no tuvieron relevancia para esta hipótesis. El modelo es:

Probabilidad de Normalidad Cromosómica =

1

$$1 + e^{-(1.022 - 0.081 \cdot \text{edad} - 0.306 \text{Mn1} - 0.440 \text{Mn2} - 0.471 \text{Mn3} - 19.722 \text{Mn4} - 0.293 \text{Sim2} - 0.566 \text{Sim3} - 0.064 \text{CelD4} + 0.256 \text{Mor4} + 0.044 \text{Blast4} + 1.394 \text{Mor} + 1.958 \text{BT} + 2.161 \text{BC} + 2.408 \text{BE} + 2.319 \text{BHi} + 2.383 \text{BH})}$$

2.5 Análisis de la prueba diagnóstica.

Sensibilidad: 25.2 % porcentaje de normales correctamente clasificados, probabilidad de que el embrión normal se clasifique como normal.

Especificidad: 89.7% porcentaje de anormales correctamente clasificados, probabilidad de que el embrión anormal se clasifique como anormal.

Valor predictivo positivo: 55.9% cuando la fórmula ha diagnosticado normal, qué probabilidad hay de que sea normal. Probabilidad de que un embrión clasificado como normal sea normal.

Valor predictivo Negativo: 69.9% cuando la fórmula ha diagnosticado anormal, que realmente lo sea.

3 GESTACIÓN CLÍNICA (marcadores o variables relacionadas y/o predictivas de gestación clínica).

Se pretendió cuantificar el efecto que determinados patrones clínicos, observados o efectuados, ejercieron sobre la implantación embrionaria en el programa de DGP.

Clasificando las variables en categorías, en función de los momentos y origen de las mismas, mediante la regresión logística y el método forward de máxima verosimilitud nos quedamos solo con aquellas variables que tuvieron un efecto relevante.

Primero se cuantificó su efecto mediante el OR y su IC, después utilizamos las variables importantes para crear un modelo predictivo que permitiera obtener una predicción en función de una serie de variables clínicas.

3.1 Morfología embrionaria.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Morfología Espermática	-	-	No relevante	-
Pentoxifilina	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	No relevante	-

Tabla 29: Resultados. Morfología espermática e implantación.

En un modelo de regresión logística, y analizando la relevancia de la morfología espermática y del uso de la pentoxifilina durante la ICSI y su influencia en la tasa de implantación del embrión, se observó que ninguno de estos dos parámetros era relevante. En consecuencia, el hecho de que se inyectaran espermatozoides con morfología anormal o que fuera necesaria la utilización de pentoxifilina por la ausencia de movilidad, no influyó sobre la posibilidad de implantación posterior del embrión. La significancia del modelo fue calculada con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R2.

RESULTADOS

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Patrón pronuclear I	-	-	No relevante	-
Patrón pronuclear II	-	-	No relevante	-
Patrón pronuclear III	-	-	No relevante	-
Patrón pronuclear IV	-	-	No relevante	-
Simetría pronuclear	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	No relevante	-

Tabla 30: Resultados. Patrón pronuclear e implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de la morfología del cigoto, concretamente, el patrón pronuclear definido por Scott con sus 4 tipos (12) y la simetría de los dos pronúcleos también definida en la sección de material y métodos. En referencia al patrón pronuclear, los distintos tipos no fueron estadísticamente significativos y por lo tanto, la simetría de los pronúcleos no fue un parámetro relevante en cuanto a lo que implantación embrionaria respecta.

La significancia del modelo fue calculada con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R².

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Número de células	-	-	No relevante	-
% Fragmentación	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo I	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo II	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo III	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo IV	-	-	No relevante	-
Simetría I	-	-	No relevante	-
Simetría II	-	-	No relevante	-
Simetría III	-	-	No relevante	-
Multinucleación (1)	-	-	No relevante	-
Multinucleación (2)	-	-	No relevante	-
Multinucleación (3)	-	-	No relevante	-
Multinucleación (4)	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	No relevante	-

Tabla 31: Resultados. Morfología embrionaria en día 2 e implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión en día 2 de desarrollo, tomando en cuenta el número de células, así como el porcentaje y el tipo de fragmentación, la simetría embrionaria y la multinucleación. Ninguna de las variables, por

separado ni en su conjunto, pareció tener relevancia en cuanto a la implantación.

La significancia del modelo fue calculada con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R^2 .

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R^2
Número de células	-	-	No relevante	-
% Fragmentación	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo I	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo II	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo III	-	-	No relevante	-
Fragmentación Tipo IV	-	-	No relevante	-
Simetría I	-	-	No relevante	-
Simetría II	-	-	No relevante	-
Simetría III	-	-	No relevante	-
Multinucleación (1)	-	-	No relevante	-
Multinucleación (2)	-	-	No relevante	-
Multinucleación (3)	-	-	No relevante	-
Multinucleación (4)	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	NO MODELO	-

Tabla 32: Resultados. Morfología embrionaria en día 3 e implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 3 de desarrollo, teniendo en cuenta el número de células, así como el porcentaje y el tipo de fragmentación, la simetría embrionaria y la multinucleación. Ninguna de las variables, por separado ni en su conjunto, pareció tener relevancia en cuanto a la implantación.

La significancia del modelo fue calculada con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R^2 .

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R^2
Bloqueado	-	-	No relevante	-
Células	-	-	No relevante	-
Mórula	-	-	No relevante	-
Blastocisto	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	No relevante	-

Tabla 33: Resultados. Morfología embrionaria en día 4 e implantación.

RESULTADOS

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 4 de desarrollo, tomando en cuenta el estadio, es decir, células, mórula o blastocisto.

Tomando como referencia los embriones bloqueados, se observó que ninguno de los estadios implicados (células, mórula y blastocisto), tuvo relevancia respecto de la implantación.

La significancia del modelo se calculó con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable, sobre la normalidad embrionaria, se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R2.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Blastocisto (N=1012)	-	-	-	-
Bloqueado (n=16)	-	-	ns	-
Mórula (n=341)	0.199	0.109-0.362	0.00001	-
Modelo	-	-	0.0001	0.063

Tabla 34: Resultados. Morfología embrionaria en día 5 e implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características morfológicas del embrión, en día 5 de desarrollo, tomando en cuenta el estadio, es decir, mórula o blastocisto. Se observó que a nivel del estadio de mórula la tasa de implantación disminuyó significativamente con una OR de 0.199, con una relevancia clínica muy alta.

La significancia del modelo, que hace referencia a la morfología en día 5 y su capacidad de predecir la implantación embrionaria, se calculó con el test ómnibus (*likelihood ratio*). La OR del efecto de cada variable sobre la normalidad embrionaria se expresa junto con el intervalo de confianza del 95% (IC) R2.

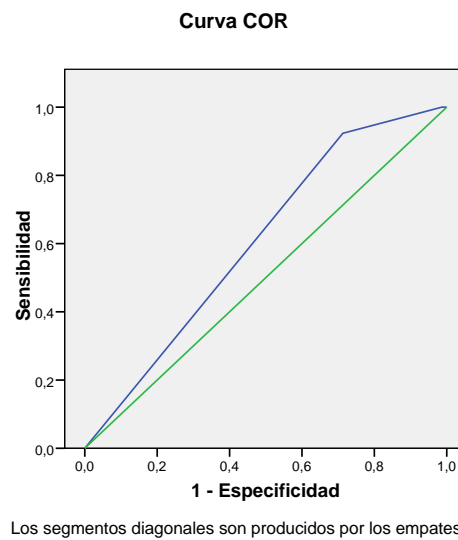


Figura 25: Resultados. Curva ROC modelo predictivo implantación día 5.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.606	.020	.000	.566	.646

Tabla 35: Resultados. Área bajo la curva modelo predictivo implantación día 5.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.606), observamos implantación que el estadio embrionario, en día 5 de desarrollo, no tuvo valor predictivo por sí mismo sobre la implantación del embrión, a pesar de ser estadísticamente significativo, su valor fue cercano a 0.5, que definiría la ausencia de relación.

RESULTADOS

3.2 Variables clínicas.

3.2.1 Etiologías (modelo edad implantación).

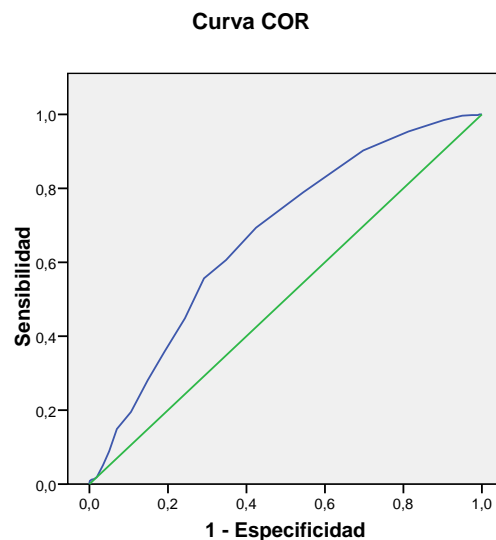
Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Edad Materna (años)	1.095	1.016-1.180	0.017	-
Etiología Femenina Normal	-	-	-	-
Aborto Repetición	0.708	0.3621-1.384	-	-
Fallo de implantación	0.290	0.126-0.668	-	-
Ovario Poliquístico	0.524	0.190- 1.447	-	-
Edad materna avanzada	0.477	0.241-0.944	-	-
Baja Respuesta	1,812	0.734- 4.477	-	-
Endometriosis	0.667	0.213-2.089	-	-
Causa Genética	0.218	0.028-1.695	-	-
Etiología masculina	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	0.0001	0.103

Tabla 36: Resultados. Etiología e implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características de la paciente tales como la edad materna (años). Considerando la etiología femenina normal como nuestro grupo de referencia, comparamos cómo el resto de indicaciones condicionaban el éxito reproductivo, concretamente aborto de repetición, fallo de implantación, ovario poliquístico, edad materna avanzada, baja respuesta, endometriosis, causa genética y etiología masculina sobre la implantación embrionaria.

Según el modelo, la edad materna, considerada en años, fue un parámetro significativo, aunque clínicamente no relevante, con una OR de 1.09. Curiosamente, esta relación positiva indicó que una vez conseguida la transferencia de un embrión euploide, a mayor edad mejoraban ligeramente las probabilidades de implantación. No obstante, tenemos que recordar que en edades inferiores a 38 años, otras indicaciones de DGP tales como fallos previos de implantación, pueden sesgar la evaluación de este parámetro.

Respecto a las etiologías, nuestro análisis reveló que sólo aquellos pacientes con indicación de fallo previo de implantación, o edad materna avanzada, vieron afectado negativamente su éxito reproductivo.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 26: Resultados. Curva ROC modelo predictivo implantación etiologías.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada + Edad
Etiología

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.671	.013	.000	.646	.696

Tabla 37: Resultados. Área bajo la curva. Modelo predictivo implantación etiologías.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.671), comprobamos que las características del paciente en cuanto a indicaciones y edad, no tuvieron valor predictivo por sí mismo sobre la implantación del embrión, a pesar de que la edad expresada como años era estadísticamente significativa, su valor fue cercano a 0.5, que definiría la ausencia de relación.

RESULTADOS

3.2.2 Estimulación (modelo edad estimulación).

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Edad Materna	0.903	0.887-0.920	No relevante	
Agonista	-	-	No relevante	-
Antagonista	-	-	No relevante	
FSH	-	-	No relevante	-
HMG	-	-	No relevante	-
FSH+HMG	-	-	No relevante	-
FSH+LH	-	-	No relevante	-
Días Estimulación	-	-	No relevante	-
Total Gonadotropinas dosis	-	-	No relevante	-
Estradiol Niveles (antes HCG) X100	0.964	0.948-0.981	0.001	-
Progesterona Niveles (antes HCG)	-	-	No relevante	-
Modelo Final	-	-	0.000	0.032

Tabla 38: Resultados. Modelo predictivo estimulación e implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de las características de la estimulación tales como la edad materna, tipo de fármaco empleado, uso de agonista o antagonista, días de estimulación, dosis total de gonadotropinas, niveles de estradiol y progesterona antes de la administración de HCG, y su influencia sobre la implantación embrionaria.

Tomadas todas en conjunto no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la implantación embrionaria, si bien la edad y los niveles de estradiol tuvieron algo más de influencia con OR cercanas a 1, siendo estos últimos estadísticamente significativos ($p=0.001$).

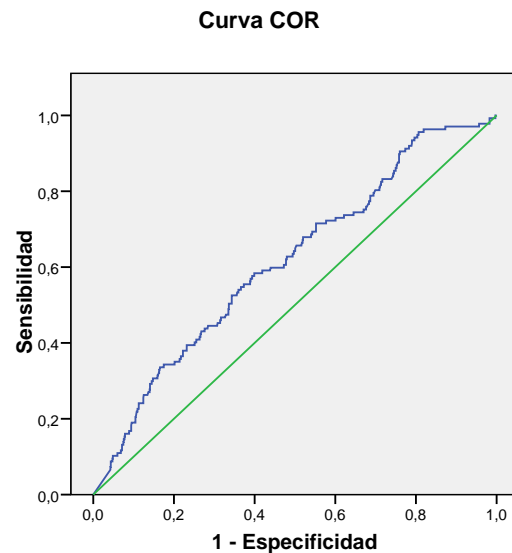


Figura 27. Resultados. Curva ROC modelo predictivo estimulación e implantación.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada por procesos de estimulación

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.615	.025	.000	.565	.665

Tabla 39: Resultados. Área bajo la curva modelo predictivo estimulación e implantación.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.615), observamos que el tipo de fármaco empleado no tuvo valor predictivo por sí mismo sobre la implantación del embrión, ni tampoco los niveles de estradiol previos a la punción ovárica a pesar de ser estadísticamente significativos, si bien su valor fue cercano a 0.5, que definiría la ausencia de relación.

RESULTADOS

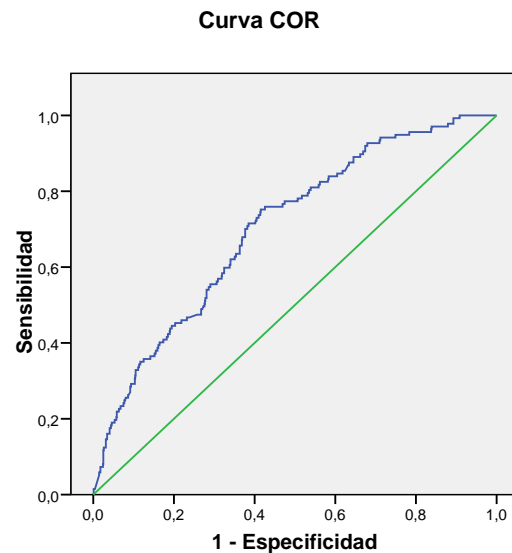
3.3 Modelo predictivo final implantación DGP.

Parámetro	Odds Ratio	C.I. 95%	Significancia	R ²
Niveles Estradiol dhCG x100	0.963	0.946-0.980	0.0001	-
Mórula	-	-	-	-
BT	2.352	1.121-4.934	0.024	-
BC	3.422	1.561-7.517	0.002	-
BE	3.272	1.140-9.398	0.028	-
BHi	5.712	2.958-11.030	0.000	-
BH	7.754	1.362-44.124	0.021	-
Modelo Final	-	-	0.0001	0.101

Tabla 40: Resultados. Modelo predictivo final implantación.

En un modelo de regresión logística se analizó la relevancia de los niveles de estradiol y del estadio del embrión transferido (mórula, blastocisto temprano, blastocisto cavitado, blastocisto expandido, blastocisto *hatching* y blastocisto *hatched*) en un programa de DGP, sobre la implantación embrionaria.

Tomando como referencia el estadio de embrión en mórula, y teniendo en cuenta las OR, comprobamos cómo la posibilidad de implantación aumentó progresivamente desde blastocisto temprano hasta blastocisto *hatched*, siendo más de siete veces superior que en el de mórula. En cuanto a los niveles previos de estradiol, sí fueron estadísticamente significativos y aunque parecían influir en la implantación, no tuvieron valor predictivo por sí mismos.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 28. Resultados. Curva ROC modelo predictivo final implantación.

Área bajo la curva.

Variables resultado de contraste: Probabilidad pronosticada modelo final

Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
.703	.023	.000	.659	.748

Tabla 41: Resultados. Área bajo la curva modelo predictivo final implantación.

Si tomamos en cuenta el resultado del área bajo la curva (0.703), confirmamos que, en este caso, y utilizando un modelo que combinó las variables más relevantes observadas en los modelos parciales tales como los niveles previos de estradiol, y la morfología embrionaria en día 5, sí conseguimos un valor predictivo en cuanto a implantación se refiere muy superior a los modelos parciales, en este caso 0.7. Aun siendo un valor cercano, no alcanzó 0.8 y por lo tanto no podemos considerarlo de gran valor predictivo aunque sí aceptable.

3.4 Probabilidad de implantación.

$$\frac{1}{e^{-(1.596 - 0.038*(E2/100) + 0.011*BT + 0.400*BC + 0.341*BE + 0.906*BHi + 1.204*BH)}}$$

3.5 Análisis de la prueba diagnóstica.

Sensibilidad: 94.9% porcentaje de implantados correctamente clasificados, probabilidad de que el embrión que implante se clasifique como tal.

Especificidad: 23.2% porcentaje de no implantados correctamente clasificados, probabilidad de que el embrión que no implante, se clasifique como no implantado.

Valor predictivo positivo: 15.0% cuando la fórmula ha diagnosticado que implanta, qué probabilidad hay de que implante. Probabilidad de que un embrión clasificado como normal sea normal.

Valor predictivo negativo: 97.0 % cuando la fórmula ha diagnosticado que no implanta, qué probabilidad hay de que realmente no implante.

DISCUSIÓN

V DISCUSIÓN

Desde los inicios de las técnicas de reproducción asistida y el nacimiento del primer bebé en 1978, los laboratorios de FIV han tratado, y tratan actualmente, de conseguir la elección del mejor embrión posible a transferir.

En los últimos años, se han llevado a cabo grandes mejoras a todos los niveles, tales como nuevos y más personalizados protocolos de estimulación, medios de cultivo embrionario con composiciones mucho más eficaces, laboratorios con unas condiciones totalmente controladas en cuanto a equipos, calidad del aire, control de partículas, etc.

Respecto a las técnicas empleadas, la fecundación in vitro convencional se vio complementada con la aparición de la microinyección intracitoplasmática y el diagnóstico genético preimplantacional. Más recientemente, también se han unido la tecnología *time lapse* y la vitrificación como parte de la rutina del laboratorio.

Todos los esfuerzos van dirigidos hacia la consecución e identificación del embrión que dará lugar a un embarazo evolutivo y a un recién nacido sano en casa. El objetivo a alcanzar debería ser la transferencia de un único embrión, pero manteniendo los resultados en cuanto a tasas de gestación se refiere.

En los comienzos de la reproducción asistida, se transferían de rutina de tres a cuatro embriones para conseguir unas tasas de gestación aceptables. El gran *handicap* era el elevado porcentaje de gestaciones múltiples que se obtenían, con el consiguiente perjuicio a nivel obstétrico y pediátrico.

Más adelante, y aún en la actualidad, la tendencia es transferir dos embriones, ya que deben mantenerse los resultados conseguidos hasta ahora, y es por eso que los porcentajes de embarazos múltiples siguen siendo todavía altos.

El principal método de elección de los embriones a transferir sigue siendo la morfología. La extensión del cultivo hasta el estadio de blastocisto,

DISCUSIÓN

así como el *screening* cromosómico y la tecnología *time lapse*, forman parte de la rutina del laboratorio de FIV para ayudar al embriólogo/a en la selección del embrión con mayor potencial de implantación.

La observación estática de los embriones tiene sus limitaciones, puesto que la evaluación se produce en momentos puntuales del desarrollo, tanto de gametos como de embriones, y eso puede hacernos perder datos relevantes que nos podrían aportar información adicional de cara a una mejor selección. Además, se somete a los embriones a un cambio en las condiciones ideales de cultivo con cada observación.

Algunos de estos inconvenientes parecen estar resueltos con el uso del *time lapse*, ya que evita sacar los embriones del incubador para observarlos.

A favor del método tradicional hemos de decir que es no invasivo, sencillo y rápido, aunque es algo subjetivo y requiere personal formado y especializado. Otro punto en contra podría ser la estandarización de criterios, tarea no siempre fácil.

A lo largo de los últimos 30 años, se han acumulado gran cantidad de datos morfológicos y de experiencia. Se han establecido incluso clasificaciones en base a la morfología que tratan de correlacionarla con tasas de implantación.

Los criterios morfológicos a tener en cuenta siguen siendo básicamente los mismos. Así pues hablamos de patrón pronuclear, número de células, simetría, fragmentación y multinucleación. También se añaden, para completar la evaluación, la morfología ovocitaria y espermática, así como la división temprana.

Si hablamos de morfología del blastocisto, nos referiremos entonces al grado de cavitación del mismo así como a la morfología de la masa celular interna y del trofoectodermo.

En la presente tesis se tuvieron en cuenta dos partes bien diferenciadas:

1. Por un lado la morfología de gametos y embriones hasta estadio de blastocisto y su correlación con la carga cromosómica del

embrión, analizada mediante el DGP. Además, se incluyeron variables clínicas tales como la etiología y la estimulación, y se trató de elaborar un modelo predictivo final que nos correlacionara la morfología embrionaria con los embriones euploides.

2. Por otro lado, y una vez conocidos los resultados del *screening* cromosómico, se trató de correlacionar la morfología embrionaria, y las variables clínicas antes mencionadas, con la tasa de implantación en un programa de DGP, intentando obtener un modelo predictivo.

1 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

La morfología embrionaria sigue siendo el patrón predominante a la hora de seleccionar los embriones candidatos a transferencia. El objetivo de nuestro estudio fue valorar la posible relación entre la morfología del embrión, en día 3 de desarrollo, y su normalidad o anormalidad cromosómica. También, y como objetivo secundario, se valoró la morfología del embrión en estadio de mórula o blastocisto y su correlación con las anomalías cromosómicas.

Para ello fueron evaluados los embriones de las pacientes pertenecientes al programa de DGP en la clínica IVI Valencia desde enero de 2000 hasta mayo del 2007. Todos los ciclos tuvieron lugar en las instalaciones de la clínica y las pacientes firmaron los consentimientos requeridos por la ley de reproducción asistida previamente a la realización de cualquier procedimiento.

Las indicaciones para el DGP fueron:

1. Edad materna avanzada (≥ 38 años).
2. Fallo repetido de implantación (≥ 3).
3. Aborto de repetición (≥ 2).
4. Factor masculino severo.

5. Gestación previa con cromosomopatía.

El método de evaluación embrionaria empleado fue el score embrionario utilizado de rutina, en el laboratorio de fecundación in vitro, por los embriólogos/as clínicos del IVI Valencia.

1.1 Morfología embrionaria.

Actualmente, en la mayoría de los laboratorios de FIV, el parámetro de mayor peso a la hora de seleccionar los embriones a transferir es la morfología embrionaria. En general, la observación estática tiene en cuenta varios estadios tales como la fecundación, el desarrollo embrionario y el estadio en blastocisto.

Los parámetros evaluados son el número de pronúcleos y de corpúsculos polares, el número de células, la simetría, la multinucleación, la fragmentación, el grado de expansión del blastocisto y la calidad de la masa celular interna y del trofoectodermo.

Sabemos que, embriones de morfología óptima pueden no implantar y aquellos considerados subóptimos pueden dar lugar al nacimiento de un recién nacido vivo sano.

Las aneuploidías son el principal factor genético que afecta al éxito de los tratamientos de reproducción asistida. Algunos estudios consideran la relación entre la morfología embrionaria y las aneuploidías (61, 97). Otros, también han evaluado la relación entre la morfología en día 3 con las aneuploidías y con la tasa de llegada a blastocisto (98).

En nuestro caso, el primer parámetro estudiado fue la morfología espermática y el uso o no de pentoxifilina durante la ICSI y su relevancia respecto a la normalidad cromosómica del embrión.

Desde la aparición de la ICSI (4) en los laboratorios de FIV y la mejora que ello supuso, muchos han sido los estudios respecto a la calidad seminal y sus consecuencias en los resultados de los ciclos de reproducción asistida (99).

Algunos autores ven incrementadas las anomalías cromosómicas debido a la calidad espermática (100, 101) frente a otros grupos que no encuentran que sea así (90, 102). En nuestro estudio, la morfología espermática no fue determinante a la hora de obtener embriones euploides. En consecuencia, el hecho de que se inyectaran espermatozoides con morfología anormal o que fuera necesaria la utilización de pentoxifilina, por la ausencia de movilidad, no nos aumentó el riesgo de generar un embrión aneuploide.

Respecto al patrón pronuclear, y tomando como referencia el modelo definido por Scott (12), en nuestro caso no se observó que el patrón pronuclear fuera relevante a la hora de determinar la dotación cromosómica del embrión, si bien sí que se obtuvo mayor probabilidad de euploidía en el patrón I al compararlo con el resto de los patrones pronucleares. Estos datos concuerdan con los que han publicado otros autores (103, 56). Además, hay autores que han correlacionado los parámetros espermáticos con el *score* pronuclear observado tras la ICSI y la dotación cromosómica de los embriones resultantes (104).

La morfología embrionaria en día 3 de desarrollo, y su correlación con aneuploidías, han sido objeto de numerosos estudios (97, 16, 61, 77).

Respecto a la morfología embrionaria en día 2 y día 3 de desarrollo, en nuestros modelos pudimos observar cómo en ambos días, a mayor número de células respecto a lo que correspondería al desarrollo esperado, menor era la posibilidad de euploidía.

Estos datos concuerdan con los observados por otros autores en los que la velocidad de desarrollo sí que condicionaba la euploidía del embrión (77), viéndose que los embriones de desarrollo lento, aquéllos que se bloquean y los que tenían una velocidad de desarrollo que podía considerarse rápida, tenían incrementadas las anomalías cromosómicas.

También podemos extrapolar estos datos hacia la simetría embrionaria. Existen publicaciones que han obtenido tasas de anomalías cromosómicas elevadas en embriones con divisiones asimétricas (105, 77).

DISCUSIÓN

En nuestros resultados, la simetría no condicionó el modelo y no fue relevante por sí misma.

En cuanto al porcentaje de fragmentación, este no condicionó la posibilidad de euploidía en día 2, pero sí que la condicionó en día 3. Sin embargo, el tipo de fragmentación no condicionó el resultado en ninguno de los dos días.

Respecto a este parámetro, parece claro que el porcentaje de fragmentación sí que afecta a la dotación cromosómica final. En algunos casos, se han obtenido datos respecto al mosaicismo y otras alteraciones (poliploidías y haploidías), aneuploidías y embriones euploides (106). Según Munné, a medida que aumenta la fragmentación, se incrementa el porcentaje de embriones afectados por mosaicismo y otras alteraciones (poliploidías y haploidías) disminuyendo el número de embriones euploides disponibles. Respecto a las aneuploidías no es así, y no aumentan proporcionalmente con el aumento de la fragmentación ya que éstas están más ligadas a la edad avanzada.

En referencia al tipo de fragmentación, sí que hay estudios que han hablado de obtener una mayor posibilidad de aneuploidía referida al tipo 4 (77).

En cuanto a la multinucleación, en nuestro modelo, afectó a ambos días por igual confirmando algo que ya intuíamos y es que, a mayor número de células multinucleadas, menor posibilidad de euploidía. Por lo tanto, no tuvo valor pronóstico por sí solo.

Estos datos confirman los de otros autores como (105), que además han relacionado la asimetría en las divisiones embrionarias con el grado de multinucleación y por lo tanto con una menor posibilidad de euploidía.

Hace casi 20 años, Kligman (68) ya había encontrado correlación entre los embriones que presentaban multinucleación y los que no. En su estudio, el porcentaje de embriones aneuploides aumentaba en aquellos embriones con células multinucleadas, si bien no se encontró una relación clara entre el día de la aparición de la multinucleación, el tipo, el número de células multinucleadas,

la calidad embrionaria y la técnica empleada para inseminar los ovocitos (ICSI o FIV) respecto al ratio de embriones anormales.

El cultivo, hasta el estadio de blastocisto, se ha implementado en la actualidad en muchas clínicas de fecundación *in vitro*, debido a que los embriones que alcanzan este estadio tienen mayor potencial de implantación.

Sin embargo, la capacidad del cultivo largo hasta blastocisto de “eliminar” los embriones aneuploides sigue siendo limitada. Los blastocistos, al igual que los embriones, continúan siendo portadores de anomalías cromosómicas, si bien la frecuencia de las mismas y la incidencia del mosaicismo son inferiores a la de los embriones en día 3 de desarrollo.

Respecto a la morfología de los mismos, una proporción considerable de blastocistos cromosómicamente anormales alcanzan el máximo score y de la misma manera, algunos con peor score son euploides (107). Más de la mitad de los blastocistos testados en ese estudio habían sido catalogados como anormales. El efecto de la edad materna avanzada también estaba asociado al aumento de aneuploidías siendo del 51% en pacientes jóvenes respecto a las de edad materna avanzada donde se incrementaban hasta un 61%.

Además, en ese mismo estudio y de manera específica, el score de la MCI y del TE, condicionaban la posibilidad de la euploidía del blastocisto, siendo los scores más altos los que menos anomalías cromosómicas conllevaban.

El efecto de la edad materna y de la morfología del blastocisto, así como su posibilidad de euploidía, también ha sido estudiado por otros autores (21) corroborando muchos de los datos adelantados por Alfarawati (107).

De esta manera, Capalbo (108) también obtuvo mayor posibilidad de euploidía entre los blastocistos que alcanzaban mayor score. Además, en el citado estudio, se correlacionó de manera negativa la tasa de llegada a blastocisto (respecto al día) con la edad de la paciente, siendo mayor a menor edad. Sin embargo, el porcentaje de euploides no difería mucho entre los que llegaban a blastocisto en día 5 o en día 6 de desarrollo.

En la presente tesis, se tomó en cuenta la morfología en día 4 y día 5 de desarrollo, refiriéndonos a la llegada al estadio de blastocisto, y relacionándolo con la posibilidad de euploidía.

Los embriones en día 4 que alcanzaron el estadio de blastocisto, aunque fuera en sus formas más tempranas, tuvieron hasta cuatro veces más opciones de ser euploides respecto a aquellos que todavía se encontraban en células, y dos veces más posibilidades respecto a los que alcanzaron el estadio de mórula.

En cuanto al día 5, también la posibilidad de euploidía se vio aumentada si ya se había alcanzado el estadio de blastocisto, siendo ésta tres veces mayor.

Recientemente, hay autores (109) que con el uso de la tecnología *time lapse* y los arrays de CGH, no han encontrado diferencias significativas en cuanto a la morfocinética de los embriones euploides y aneuploides respecto al inicio de la compactación, de la blastulación y la blastulación completa dentro de un grupo de pacientes de mal pronóstico reproductivo.

Autores como Campbell (110), observaron cierto retraso en la fase de periblastulación en los embriones aneuploides respecto a los euploides y Basile (111) obtuvieron una tasa de llegada a blastocisto, dentro del grupo de embriones euploides, de un 79%. Ambas publicaciones utilizaron la tecnología *time lapse* y los arrays de CGH.

1.2 Variables clínicas.

En el apartado de variables clínicas, se establecieron dos divisiones:

1.2.1 Etiologías.

Previamente a la realización de un ciclo de fecundación *in vitro*, se contempla un estudio detallado de la pareja en función de la anamnesis y de los antecedentes previos.

Este estudio es realizado por el facultativo/a especialista en reproducción asistida que hará el diagnóstico de las etiologías que se presentan en los pacientes que acuden a una clínica de fecundación *in vitro*.

Las etiologías, tanto de origen femenino como masculino, de nuestro grupo de estudio, no tuvieron en nuestro modelo, ni por separado ni en su conjunto, valor predictivo sobre la posibilidad de euploidía.

A pesar de esto, algunas de ellas por separado, como es el caso de las pacientes de edad materna avanzada, sí que tuvieron influencia en el resultado final, viéndose aumentado el índice de aneuploidías, dato que ya había sido aportado y confirmado por autores como Munné (19, 84).

Respecto a la etiología masculina, las muestras de semen con bajos recuentos y las procedentes de biopsia testicular, también se ha comprobado que condicionan la posibilidad final de euploidía (101, 104).

1.2.2 Estimulación.

Actualmente existen distintos tipos de estimulación ovárica. En los últimos 30 años, ha existido una mejora evidente de los protocolos siendo posible personalizar los mismos según las necesidades de cada paciente. El facultativo/a será el encargado de prescribir el protocolo adecuado para cada caso clínico.

En el programa de DGP del IVI Valencia, y por lo tanto, en la presente tesis, se usaron protocolos variados con FSH, LH, HMG, agonista y antagonista de GnRH.

Además, se tuvieron en cuenta los niveles de estradiol sérico previos a la administración de la gonadotropina coriónica humana (HCG), así como los niveles de progesterona.

En el modelo previsto en la presente tesis, respecto a la estimulación, también se tuvo en cuenta la dosis total de gonadotropinas y el total de días de estimulación, así como el efecto de la edad en las pacientes incluidas en el programa de DGP.

Los datos obtenidos demostraron que en los protocolos de estimulación en los que se desensibilizó la hipófisis con antagonista (protocolo corto), aumentaron las posibilidades de generar un embrión euploide. Además, la edad de la paciente lógicamente también influyó, puesto que la posibilidad de euploidía fue menor en pacientes de mayor edad.

Este dato concuerda con los resultados presentados por el grupo de Baart (112) donde, en un estudio controlado randomizado comparando la estimulación convencional con agonistas y la estimulación media con antagonistas de la GnRH, obtuvo menor número de embriones anormales y mosaicos en esta última.

Algunos autores, previamente, también habían discutido sobre el efecto que las distintas estimulaciones y la exposición a distintas condiciones de laboratorio podían tener en la carga cromosómica del embrión (28), obteniendo diferencias en la tasa de embriones que presentaban mosaicismo.

1.3 Modelo predictivo final. Anomalías cromosómicas.

En la presente tesis, se ha pretendido cuantificar el efecto que determinadas variables clínicas ejercieron sobre la normalidad cromosómica del embrión.

Cuando se unieron todas en un modelo predictivo final, se observó que del funcionamiento de dicho modelo era posible deducir que a mayor simetría del embrión y menor multinucleación, la posibilidad de euploidía aumentaba. Datos estos que concuerdan con los presentados por otros autores (52, 68).

Además, también se observaron diferencias respecto a la velocidad de división, de manera que a mayor evolución en día 4 y día 5, mayor fue la posibilidad de euploidía. Sólo la edad de la paciente pareció influir de manera estadísticamente significativa, algo que ya habían adelantado otros autores (19).

Todos estos parámetros han sido ya comentados durante la presente discusión y podríamos concluir que, a pesar de que los resultados obtenidos

nos proporcionaron un modelo con un valor muy aceptable respecto a la posibilidad de euploidía embrionaria, finalmente no logró valor predictivo.

Por ello, aunque existe cierta relación entre la morfología embrionaria y la carga cromosómica del embrión, la morfología por sí sola no tuvo valor predictivo, puesto que embriones con peor *score* podían ser euploides (107) (108) y otros, alcanzando las mayores puntuaciones en cuanto a *score*, finalmente eran aneuploides y no podían dar lugar a gestaciones evolutivas (61, 113).

Por ello, y a la luz de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos confirmar que, para tener información adicional sobre la carga cromosómica de los embriones obtenidos en los ciclos de fecundación *in vitro* y así evitar fallos de implantación y abortos tempranos, son necesarias técnicas complementarias como el DGP.

Además, recientes tecnologías como el *time lapse*, pueden proporcionar más datos y conocimientos sobre la morfocinética embrionaria complementando al DGP y a la morfología embrionaria.

En conclusión, todas ellas en su conjunto mejoran los resultados de gestación evolutiva dentro de los programas de fecundación *in vitro*.

2 GESTACIÓN CLÍNICA.

En la presente tesis se pretendió cuantificar el efecto que determinados patrones clínicos observados o efectuados podía provocar/ocasionar en la implantación embrionaria en el programa de DGP.

Para ello, se siguió el mismo patrón que el llevado a cabo con la morfología embrionaria. Se tuvieron en cuenta los mismos parámetros para crear modelos parciales y un modelo final con capacidad predictiva, respecto a la implantación, de los embriones transferidos una vez conocida su condición euploide.

2.1 Morfología embrionaria.

Si tenemos en cuenta todos los parámetros evaluados anteriormente tales como la calidad espermática, la morfología embrionaria en día 2, en día 3, en día 4 y en día 5 de desarrollo, en nuestro modelo solo resultó relevante la morfología embrionaria en día 5.

Evaluando las características morfológicas del embrión a transferir, en día 5, se observó que, a nivel del estadio de mórula, la tasa de implantación disminuyó significativamente, con una relevancia clínica muy alta. Es decir, el no tener un blastocisto disponible para transferir, en día 5, influyó de manera negativa sobre nuestras tasas de implantación y por lo tanto sobre nuestra tasa final de gestación en el programa de DGP.

Analizando por separado los modelos parciales, ninguno de ellos resultó relevante por sí solo ni tuvo valor predictivo. Ni siquiera la morfología embrionaria en día 5, que aunque arrojó datos con significancia estadística, por sí misma no tuvo valor predictivo como tal. Tampoco la unión de todos los modelos parciales tuvo valor predictivo.

Las características morfológicas del embrión tales como la fragmentación, la asimetría, la multinucleación y la velocidad de desarrollo han sido ampliamente estudiadas, así como su implicación sobre las tasas de implantación.

La asimetría y la multinucleación (52), así como la fragmentación (77,114) influyen en la viabilidad final del embrión.

Parece claro que la morfología embrionaria, en los estadios iniciales, condiciona las tasas de llegada a blastocisto (115) así como las tasas de implantación (116). En aquellos embriones con desarrollo más lento, y que no han alcanzado el estadio de blastocisto en día 4, las tasas de implantación se ven claramente disminuidas (114), dato que corrobora nuestro modelo de implantación en día 5.

2.2 Variables clínicas.

2.2.1 Etiologías.

En un modelo de regresión logística, se analizó la relevancia de las características de la paciente tales como la edad materna (en años), y considerando la etiología femenina normal como nuestro grupo de referencia, se estudió si el resto de indicaciones condicionaban el éxito reproductivo, concretamente aborto de repetición, fallo de implantación, ovario poliquístico, edad materna avanzada, baja respuesta, endometriosis y etiología masculina sobre la implantación embrionaria.

Según nuestro modelo, la edad materna, considerada en años, fue un parámetro significativo aunque clínicamente no relevante con una OR de 1.09. Curiosamente, esta relación positiva nos indicó que, una vez conseguida la transferencia de un embrión euploide, a mayor edad mejoraban ligeramente las probabilidades de implantación. No obstante, hay que recordar que en edades inferiores a 38 años, otras indicaciones de DGP tales como un fallo de implantación previo en un ciclo de reproducción asistida, pueden sesgar la evaluación de este parámetro.

Autores como Munné (19), ya habían publicado sobre la influencia de la edad materna avanzada respecto a las aneuploidías, pero también habían comparado la incidencia de las mismas en otros grupos como pacientes con aborto de repetición y con fallos de implantación con tasas similares. Después del DGP, en el citado estudio, las tasas de implantación se vieron incrementadas gracias al análisis cromosómico.

Más recientemente, el grupo de Capalbo (108) ha correlacionado negativamente la tasa de llegada a blastocisto con la edad materna, si bien una vez obtenido el embrión euploide, las tasas de implantación son similares. También son similares en función del día de llegada a blastocisto y curiosamente, embriones con peor *score* obtienen tasas de implantación parecidas, si bien la *n* en estos casos es muy pequeña.

2.2.2 Estimulación.

El modelo parcial referente al tipo de fármaco empleado, las dosis utilizadas, los días de estimulación necesarios, los niveles previos de estradiol y de progesterona así como la edad de la paciente, no tuvieron de manera conjunta un efecto predictivo sobre la implantación.

De manera individual, sólo los niveles previos de estradiol resultaron estadísticamente significativos, pero sin tener valor predictivo. Este dato parece confirmar los obtenidos previamente por el grupo de Simón (117), donde niveles séricos de estradiol más bajos, previos a la punción ovárica en pacientes con alta respuesta, mejoraron las tasas de implantación, siendo los valores más elevados los de peor pronóstico.

2.3 Modelo predictivo final de implantación en un programa de DGP.

Uno de los objetivos secundarios de la presente tesis fue establecer un modelo predictivo de implantación respecto a los embriones euploides obtenidos del programa de DGP.

Para ello se tomaron en cuenta las variables más relevantes de los otros modelos parciales tales como los niveles de estradiol séricos, previos a la administración de la HCG, y la morfología embrionaria en día 5 de los embriones cromosómicamente normales que iban a ser transferidos, con estadios que iban desde mórula hasta blastocisto eclosionado o *hatched*.

Así se observó cómo las posibilidades de implantación aumentaron, de manera progresiva desde mórula hasta blastocisto *hatched*, con una posibilidad hasta siete veces mayor en este último estadio, siendo todos valores estadísticamente significativos.

El estradiol por su parte, y como ya se ha comentado anteriormente, pareció influir en la implantación, pero sin llegar a ser predictivo.

Estos datos son contrarios a los presentados recientemente por el grupo de Capalbo (108), que obtuvo unos resultados de implantación muy similares

entre blastocistos de distinta morfología, una vez conocida su condición euploide, lo que viene a concluir que la morfología no fue predictiva sobre la capacidad de implantación.

En el citado estudio, tampoco fueron estadísticamente significativas las diferencias en la tasa de implantación referidas a la calidad de la masa celular interna y del trofoectodermo. Además, el día de llegada al estadio de blastocisto, día 5 o día 6, tampoco condicionó la implantación.

Contrariamente a estos datos, autores como Richter (118), sí que encontraron diferencias en cuanto a la implantación en función del día de llegada a blastocisto, así como de la morfología de la masa celular interna y del trofoectodermo. De esta manera, los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, en día 5, y que además presentaron un buen *score* en cuanto a MCI y TE, obtuvieron mejores tasas de implantación.

También otros estudios que combinaron la morfología *time lapse* con la observación estática tradicional (119), obtuvieron resultados en los que se observó cierta tendencia a unas tasas de implantación mejores en aquellos casos en los que el inicio de la blastulación fue más temprano.

En consonancia con los datos que arrojó nuestro modelo, autores como Gardner (120), sí que han encontrado diferencias en las tasas de implantación en función de la calidad de los blastocistos transferidos, siendo estas mayores cuanto mejor es el *score*.

Por lo tanto podemos concluir que aunque nuestro modelo global no puede ser considerado predictivo como tal, sí es aceptable su utilización dentro de nuestro programa de DGP.

CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

1. La morfología embrionaria por sí misma no tuvo valor predictivo sobre la carga cromosómica del embrión.

2. No existió ningún parámetro morfológico por separado que condicionara de manera absoluta la probabilidad de euploidía.

3. La edad materna avanzada aumentó la posibilidad de aneuploidía.

4. Los distintos modelos parciales no fueron predictivos respecto a la carga cromosómica del embrión, aunque se obtuvieron valores aceptables. Cuanto mejor fue el patrón morfológico, mayor probabilidad de euploidía.

5. Las variables clínicas incluidas en los distintos modelos parciales tales como la etiología, la estimulación, los valores hormonales y la indicación para el DGP, no tuvieron, ni por separado ni en su conjunto, valor predictivo de euploidía.

6. El único factor determinante respecto a la tasa de implantación en nuestro modelo final de implantación fue la morfología embrionaria en día 5 de desarrollo, si bien no tuvo valor predictivo.

7. La única posibilidad de certeza respecto a la carga cromosómica del embrión fue el uso de las técnicas de diagnóstico genético preimplantacional.

BIBLIOGRAFÍA

VII BIBLIOGRAFÍA

(1) Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978 Aug 12;2(8085):366.

(2) Daya S, Wikland M, Nilsson L, Enk L. Fertilization and embryo development of oocytes obtained transvaginally under ultrasound guidance. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1987 Dec;4(6):338-342.

(3) Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998 Dec;70(6):1022-1029.

(4) Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992 Jul 4;340(8810):17-18.

(5) Winston RM, Handyside AH, Penketh RJ. Embryo biopsy. *Lancet* 1989 Apr 15;1(8642):839.

(6) Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston R. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344(6268):768-770.

(7) Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yaeger BJ, Larsen FW. Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2008;90(6):2138-2143.

(8) Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011 Oct;26(10):2658-2671.

(9) Veeck LL. An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology. : Parthenon Publishing Group New York; 1999.

(10) Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive biomedicine online* 2005;10(5):669-681.

(11) Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999 May;14(5):1318-1323.

(12) Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive biomedicine online* 2003;6(2):201-214.

(13) Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;76(6):1150-1156.

(14) Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive biomedicine online* 2006;12(5):608-615.

(15) Kovalevsky G, Patrizio P. High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 2005;84(2):325-330.

(16) Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reproductive biomedicine online* 2000;1(1):17-26.

(17) Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003 Jan;18(1):182-188.

(18) Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999;72(5):837-844.

(19) Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive biomedicine online* 2007;14(5):628-634.

(20) Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ, et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Hum Reprod* 2010 Aug;25(8):1916-1926.

(21) Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod* 2014 Feb;20(2):117-126.

(22) Palermo G, Munne S, Cohen J. The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod* 1994 Jul;9(7):1220-1225.

(23) Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, Prapas Y, Handyside AH. The centrosome and early embryogenesis: clinical insights. *Reproductive biomedicine online* 2008;16(4):485-491.

(24) Moomjy M, Colombero LT, Veeck LL, Rosenwaks Z, Palermo GD. Sperm integrity is critical for normal mitotic division and early embryonic development. *Mol Hum Reprod* 1999 Sep;5(9):836-844.

(25) Delgado A, De Los Santos M, Buendia P, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Increased incidence of mosaic embryos with the microinjection of spermatozoa with abnormal morphology. *Fertil Steril* 2007;88:S229-S230.

(26) Rodrigo L, Rubio C, Peinado V, Villamón R, Al-Asmar N, Remohí J, et al. Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples. *Fertil Steril* 2011;95(3):1005-1012.

(27) Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990 Jul;54(1):102-108.

(28) Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, et al. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1997 Apr;12(4):780-784.

(29) Emiliani S, Gonzalez-Merino E, Van den Bergh M, Abramowicz M, Englert Y. Higher degree of chromosome mosaicism in preimplantation embryos from carriers of robertsonian translocation t (13; 14) in comparison with embryos from karyotypically normal IVF patients. *J Assist Reprod Genet* 2003;20(2):95-100.

(30) Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2001;2(4):280-291.

(31) Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, et al. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996 Dec;14(4):400-405.

(32) Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med* 2009 Dec 10;361(24):2353-2365.

(33) Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Apr 27;101(17):6496-6501.

(34) Hanna CW, Bretherick KL, Gair JL, Fluker MR, Stephenson MD, Robinson WP. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod* 2009 May;24(5):1206-1211.

(35) Janny L, Menezo YJ. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1996 Sep;45(1):31-37.

(36) Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Influence of patient age on the growth and transfer of blastocyst-stage embryos. *Fertil Steril* 2002;77(4):700-705.

(37) Magli M, Gianaroli L, Ferraretti A. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183:S29-S34.

(38) Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod* 2000 Aug;15(8):1781-1786.

(39) Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munne S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001 Sep;16(9):1954-1958.

(40) Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002 Feb;17(2):413-419.

(41) Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn* 2007;27(8):748-756.

(42) Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011 Jun;26(6):1270-1283.

(43) Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992 Mar;7(3):379-390.

(44) Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive biomedicine online* 2006;12(4):507-512.

(45) Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 2009 Sep-Oct;15(5):573-585.

(46) Rosenbusch B, Schneider M, Glaser B, Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod* 2002 Sep;17(9):2388-2393.

(47) Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 2004 Jul;19(7):1591-1597.

(48) Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommerguber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reproductive biomedicine online* 2008;16(1):113-118.

(49) Akarsu C, Çağlar G, Vicdan K, Sözen E, Biberoğlu K. Smooth endoplasmic reticulum aggregations in all retrieved oocytes causing recurrent multiple anomalies: case report. *Fertil Steril* 2009;92(4):1496. e1-1496. e3.

(50) Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001 Dec;16(12):2652-2657.

(51) Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998 Jan;13(1):182-187.

(52) Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001 Feb;16(2):313-318.

(53) Zygotes cleaving directly into more than two cells after 25-27 h in culture are predominantly chromosomally abnormal. *Human Reproduction: OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND*; 2006.

(54) Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001 Nov;16(11):2357-2361.

(55) Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003;80(2):341-349.

(56) Edirisinghe W, Jemmott R, Smith C, Allan J. Association of pronuclear Z score with rates of aneuploidy in in vitro-fertilised embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 2005;17(5):529-534.

(57) James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod* 2006 Jun;21(6):1599-1604.

(58) Weitzman VN, Schnee-Riesz J, Benadiva C, Nulsen J, Siano L, Maier D. Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes. *Fertil Steril* 2010;93(2):658-662.

(59) Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet* 2003;20(8):309-313.

(60) Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod* 2001 Feb;16(2):326-332.

(61) Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reproductive biomedicine online* 2006;12(2):234-253.

(62) Hertig AT, Rock J, Adams EC, Mulligan WJ. ON THE PREIMPLANTATION STAGES OF THE HUMAN OVUM-A DESCRIPTION OF 4 NORMAL AND 4 ABNORMAL SPECIMENS RANGING FROM THE 2ND TO THE 5TH DAY OF DEVELOPMENT. *Contributions to Embryology* 1954;35(240):201-&.

(63) Pickering SJ, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Mol Hum Reprod* 1995;1(5):254-264.

(64) Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod* 1997 Apr;12(4):800-804.

(65) Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998;70(1):60-66.

(66) Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003 May;18(5):1062-1069.

(67) Winston NJ, Braude PR, Pickering SJ, George MA, Cant A, Currie J, et al. The incidence of abnormal morphology and nucleocytoplasmic ratios in 2-, 3- and 5-day human pre-embryos. *Hum Reprod* 1991 Jan;6(1):17-24.

(68) Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996 Jul;11(7):1492-1498.

(69) Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998;70(1):60-66.

(70) Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 Apr;13(4):960-963.

(71) Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987 Nov;2(8):705-708.

(72) Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995 Sep;10(9):2427-2431.

(73) Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997 Jul;12(7):1545-1549.

(74) Edwards R, Steptoe P, Purdy J. ESTABLISHING FULL-TERM HUMAN PREGNANCIES USING CLEAVING EMBRYOS GROWN IN VITRO*. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1980;87(9):737-756.

(75) Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999 Sep;14(9):2345-2349.

(76) Almeida PA, Bolton VN. The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development in vitro. *Reproduction, fertility and development* 1996;8(2):235-241.

(77) Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007;87(3):534-541.

(78) Handyside A. Sex and the single cell. *New Sci* 1990 Apr 21;126(1713):34-35.

(79) Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 Apr;13(4):781-782.

(80) Kahraman S, Findikli N, Berkil H, Bakircioglu E, Donmez E, Sertyel S, et al. Results of preimplantation genetic diagnosis in patients with Klinefelter's syndrome. *Reprod Biomed Online* 2003 Oct;7(3):346-352.

(81) Gonzalez-Merino E, Hans C, Abramowicz M, Englert Y, Emiliani S. Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47,XYY men. *Fertil Steril* 2007 Sep;88(3):600-606.

(82) Hook EB, Cross PK, Jackson L, Pergament E, Brambati B. Maternal age-specific rates of 47,+21 and other cytogenetic abnormalities diagnosed in the first trimester of pregnancy in chorionic villus biopsy specimens: comparison with rates expected from observations at amniocentesis. *Am J Hum Genet* 1988 Jun;42(6):797-807.

(83) Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001 Jul;9(7):539-547.

(84) Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995 Aug;64(2):382-391.

(85) Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003 Jul-Aug;7(1):91-97.

(86) Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J Soc Gynecol Investig* 2003 Sep;10(6):315-322.

(87) Vidal F, Gimenez C, Rubio C, Simon C, Pellicer A, Santalo J, et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998 May;15(5):310-313.

(88) Simon C, Rubio C, Vidal F, Gimenez C, Moreno C, Parrilla JJ, et al. Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev* 1998;10(1):87-92.

(89) Rubio C, Buendia P, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Peinado V, et al. Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2009 May;18(5):687-693.

(90) Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002 Oct;17(10):2600-2614.

(91) Vernaeye V, Bonduelle M, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Devroey P. Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2003 Oct;18(10):2093-2097.

(92) Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2005 Aug;20(8):2140-2152.

(93) Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reproductive biomedicine online* 2005;11(4):497-506.

(94) Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, et al. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2010;94(4):1380-1386.

(95) Tarkowski A. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetic and Genome Research* 1966;5(6):394-400.

(96) De Placido G, Wilding M, Strina I, Mollo A, Alviggi E, Tolino A, et al. The effect of ease of transfer and type of catheter used on pregnancy and implantation rates in an IVF program. *J Assist Reprod Genet* 2002;19(1):14-18.

(97) Magli M, Gianaroli L, Munné S, Ferraretti A. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet* 1998;15(5):297-301.

(98) Eaton JL, Hacker MR, Harris D, Thornton KL, Penzias AS. Assessment of day-3 morphology and euploidy for individual chromosomes in embryos that develop to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2009;91(6):2432-2436.

(99) De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003;79(1):42-48.

(100) Van Opstal D, Los FJ, Ramlakhan S, Van Hemel JO, Van Den Ouweland AM, Brandenburg H, et al. Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997 Apr;12(4):682-686.

(101) Magli M, Gianaroli L, Ferraretti A, Gordts S, Fredericks V, Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reproductive biomedicine online* 2009;18(4):536-542.

(102) Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 Apr;13(4):781-782.

(103) Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simon C, Remohi J, et al. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003 Nov;18(11):2413-2419.

(104) Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Donmez E, Benkhalifa M, Findikli N, et al. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 2002 Dec;17(12):3193-3200.

(105) Hardarson T, Caisander G, Sjogren A, Hanson C, Hamberger L, Lundin K. A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum Reprod* 2003 Feb;18(2):399-407.

(106) Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, et al. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reproductive biomedicine online* 2004;8(1):81-90.

(107) Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011 Feb;95(2):520-524.

(108) Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod* 2014 Jun;29(6):1173-1181.

(109) Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, et al. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online* 2015 Jan;30(1):57-66.

(110) Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013 May;26(5):477-485.

(111) Basile N, Nogales MdC, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril* 2014;101(3):699-704. e1.

(112) Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007 Apr;22(4):980-988.

(113) Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod* 2014 Feb;20(2):117-126.

(114) Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000 Dec;15(12):2634-2643.

(115) Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reproductive biomedicine online* 2003;6(3):323-331.

(116) Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005 May;10(5):669-681.

(117) Simón C, Velasco JJG, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohí J, et al. Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril* 1998;70(2):234-239.

(118) Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001;76(6):1157-1167.

(119) Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, et al. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC medical genomics* 2014;7(1):38.

(120) Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73(6):1155-1158.